



**Influence du statut azoté et du cycle lumineux diurne
sur le métabolisme lipidique d'*Isochrysis* sp.
(Haptophyceae)**

Thomas Lacour

► **To cite this version:**

Thomas Lacour. Influence du statut azoté et du cycle lumineux diurne sur le métabolisme lipidique d'*Isochrysis* sp. (Haptophyceae). Environnement et Société. Aix-Marseille Université, 2010. Français. NNT: . tel-00852596

HAL Id: tel-00852596

<https://theses.hal.science/tel-00852596>

Submitted on 21 Aug 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de la méditerranée (Aix-Marseille 2)

THÈSE

Présentée en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'université Aix-Marseille II

Spécialité

Sciences de l'environnement
Océanographie

Par

Thomas Lacour

Titre :

Influence du statut azoté et du cycle
lumineux diurne sur le métabolisme
lipidique d'*Isochrysis* sp. (Haptophyceae).

Directeurs de thèse : Antoine Sciandra
Patrick Mayzaud

Composition du Jury

Présidente	Madeleine Goutx
Rapporteurs	Hugh MacIntyre Claude Aflalo
Examineurs	Olivier Bernard Marc Rousset Bernard Quéguiner

Travail réalisé au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur Mer (LOV)

Cette thèse a bénéficié de financements de l'**ANR Shamash**, du **Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)** et de l'**Institut National de Recherche en Informatique et Automatique (INRIA)**.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'**ANR Shamash** (Chef de projet : Olivier Bernard).

Remerciements

Hugh MacIntyre et Claude Aflalo ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Madeleine Goutx, Bernard Queguiner et Marc Rousset ont accepté de faire partie du jury de la soutenance. Je leur présente mes plus vifs remerciements.

Je remercie Antoine Sciandra et Patrick Mayzaud, mes directeurs de thèse, pour la formation qu'ils m'ont octroyée et pour la confiance et la liberté qu'ils m'ont accordées pendant la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement Olivier Bernard pour sa confiance et son enthousiasme scientifique.

Louis Legendre m'a permis d'effectuer mon doctorat au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer et je l'en remercie.

De nombreuses personnes m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, Margaux, Fanny, Pierre, Tristan, Carmen, Audrey, je les en remercie.

Avertissement

De nos jours, les travaux de recherche doctorale doivent être de plus en plus rapidement publiés afin d'en diffuser les résultats. Pendant ma thèse de doctorat, 3 articles en premier auteur ont été réalisés pour des revues scientifiques internationales. Pour des raisons pratiques 3 de ces articles constituent des chapitres de cette thèse. Ainsi, ce document comprend des chapitres en français et des chapitres en anglais qui reprennent les articles sous une forme plus adaptée à celle du manuscrit de thèse. Le choix de ce type de présentation comporte des désavantages certains. En plus du passage d'une langue à l'autre qui peut être déroutant, certaines répétitions n'ont pu être évitées notamment dans les parties « Introduction » et « Matériels et Méthodes ». Pour faciliter la lecture du manuscrit nous avons introduit les différents articles par un résumé de ses objectifs et de ses résultats.

Résumé

Cette thèse présente différents cas d'acclimatation d'une espèce de phytoplancton (*Isochrysis* sp.) à des modifications de son environnement physico-chimique, avec une attention particulière portée sur la composante lipidique de la réponse aux changements. Dans ce contexte nous avons étudié les lipides à la fois comme produits (triacylglycerol) et acteurs (glycolipides) de la photosynthèse. Tout d'abord, nous avons étudié l'influence de plusieurs types de limitation par l'azote sur la teneur en lipides neutres des algues. Les cellules d'*Isochrysis* sp. accumulent des lipides neutres en carence en azote (croissance déséquilibrée) mais pas en croissance équilibrée limitée par l'azote (état stable). Nous nous sommes ensuite intéressés aux relations qui existent entre le cycle nycthéral et l'accumulation de réserves énergétiques sous forme de lipides et de sucres. Les réserves sont accumulées pendant le jour et consommées pendant la nuit pour alimenter la division cellulaire et la croissance nocturne. La carence en azote dans ces conditions nycthérales ne provoque pas d'accumulations significatives de lipides. Les variations diurnes de la teneur en lipides neutres sont plus importantes que les variations obtenues en carence. Grace à ces différentes expériences nous avons pu mettre en évidence les relations qui existaient entre l'environnement, la croissance, et l'accumulation de réserves. La compréhension de ces mécanismes a permis de déterminer les conditions de croissance qui favorisent la production d'huile en vue d'une utilisation biocarburant. Nous avons aussi étudié l'influence des conditions de croissance sur la composition des glycolipides des membranes des chloroplastes. Les résultats montrent que les changements de la teneur en MGDG, DGDG et SQDG et du degré d'insaturation des acides gras de ces lipides accompagnent les modifications d'activité photosynthétique des cellules induites par une limitation azotée et en cycle Jour/Nuit.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	17
1. Les réserves énergétiques du phytoplancton	21
1.1 Influence de l'azote	23
1.2 La photopériode.....	24
2. Les glycolipides : des acteurs de la photosynthèse ?	24
3. Les huiles du phytoplancton comme source de biocarburant.....	27
4. Organisation du manuscrit.....	28
 I. L'ACCLIMATATION LIPIDIQUE DES MICROALGUES EN REPONSE A DES CHANGEMENTS DE CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES : ETAT DES CONNAISSANCES	 31
1. Introduction.....	35
2. Les lipides du phytoplancton.....	35
2.1 Rappel sur les différents lipides en présence	35
2.1.1 Les principaux lipides des chloroplastes	36
2.1.2 Les lipides des autres membranes.....	37
2.1.3 Les lipides neutres, des lipides de réserves.....	37
2.2 Le métabolisme lipidique	40
2.3 La composition lipidique des micro-algues eucaryotes	45
2.3.1 Teneur en lipides totaux	45
2.3.2 Les différentes classes de lipides.....	45
2.3.3 Les acides gras.....	46
2.3.4 Variations interclonales	47
3. L'influence du cycle cellulaire et du cycle nyctéméral sur la composition lipidique	48
3.1 Influence du cycle cellulaire.....	48
3.1.1 Contrôle du cycle cellulaire par la croissance.....	49
3.1.2 La composante lipidique de la croissance somatique	51
3.2 Influence du cycle nyctéméral (jour/nuit)	52
4. Conditions environnementales et productions qualitative et quantitative de lipides	52
4.1. Généralités.....	53
4.2 Adaptation ou acclimatation ?	54
4.3 Influence de la concentration en nitrate du milieu.....	54
4.3.1 La carence en azote provoque un arrêt de la division cellulaire	54
4.3.2 La carence entraîne une accumulation de triglycérides et de sucres.....	57
4.3.3 La carence en azote provoque une diminution de l'activité photosynthétique	59
4.3.4 La carence en azote modifie la composition en acide gras des glycérolipides	60
4.4 Influence de la lumière	61
4.4.1 Modification des classes de lipides.....	62
4.4.2 Modification de l'insaturation de ces lipides.....	62
4.5 Influence de la température	63
5. Conclusion	64
 II. MATERIELS ET METHODES	 67

1. Cultures fermées versus cultures en continu	71
1.1 Batch	71
1.2 Les cultures continues	73
1.2.1 Le chémostat.....	73
1.2.2 Le turbidostat, condition limite du chemostat.....	75
1.2.3 Le cyclostat.....	75
2. L'automate de culture	77
3. Choix de l'espèce de micro-algue	79
4. Les variables physico-chimiques.....	80
4.1 Composition du milieu	80
4.2 Le pH.....	80
4.3 Lumière	80
4.4 Température	81
4.5 Axénicité	82
4.6 Homogénéité de la culture.....	82
4.7 Mesure de l'azote inorganique dissous.....	82
5. Les différents descripteurs des microalgues	83
5.1 Concentration cellulaire, Taille des cellules, Biovolume total	83
5.2 Azote et carbone particulaire.....	85
5.3 Chla, sucres totaux, protéines totales	85
6. Quantification des lipides	86
6.1 Extraction, séparation et analyse des lipides (méthode biochimique)	86
6.1.1 Extraction des lipides totaux.....	86
6.1.2 Séparation des lipides totaux en 3 fractions : glycolipides, phospholipides et neutres.....	87
6.1.3 Quantification des classes de glycolipide	89
6.1.4 Composition en acides gras d'un extrait lipidique.....	89
6.2 Quantification des lipides par la méthode du Nile red	91
6.2.1 Propriétés de la molécule.....	91
6.2.2 Modification des spectres d'excitation et d'émission du Nile red en fonction de l'environnement lipidique.....	93
6.2.3 Temps d'incubation, saturation du matériel lipidique	95
6.2.4 Saturation du matériel par le Nile red.....	97
6.2.5 Influence de la concentration cellulaire.....	97
6.2.6 Relation entre la fluorescence du Nile red et la quantité de lipide neutre.....	99
6.2.7 Conclusion.....	99
7. Traitement des données	100
7.1 Les différents types de normalisation.....	100
7.2 Carbone total vs. masse sèche	100
7.3 Taux de croissance et productivité	103

III. RESERVES ET PRODUCTION DE LIPIDES NEUTRES EN CARENCE ET EN LIMITATION AZOTEE 107

1. Neutral lipids and carbohydrates productivities as a response to the nitrogen status in the Haptophyceae <i>Isochrysis</i> sp. (T-iso).....	113
1.1 Introduction	114
1.2 Material and Methods.....	116
1.3 Results.....	120
1.3.1 Experiment 1: N starvation and recovery.	120
1.3.2 Experiment 2: N limitation.	122 -
1.3.2 Relation between C storage and N quota	129
1.4 Discussion	130
1.4.1 Accumulation of C reserves in response to N limitation	130
1.4.2 NL accumulation versus production.....	132

1.4.3 Physiological functions and ecological advantages for reserves dynamics	134
1.4.4 Carbohydrate and neutral lipid productivity	135
2. Modéliser la production d'huile par <i>Isochrysis</i> sp. dans différentes conditions de limitation par l'azote	137
2.1 Présentation du modèle	137
2.2 Optimisation de la productivité en huile des algues	139
IV. PROJET SHAMASH : LES HUILES DU PHYTOPLANKTON COMME SOURCE DE BIOCARBURANT	141
1. Introduction : Le projet Shamash	145
2. Qualité des huiles produites : la composition en acides gras de 4 espèces de phytoplancton	146
2.1 La composition en acides gras des lipides neutres et lipides totaux	147
2.2 L'huile d'algue comme biodiesel ?	149
3. Influence d'une carence en azote sur la composition des huiles produites.....	151
V. DIEL VARIATIONS OF CARBOHYDRATES AND NEUTRAL LIPIDS IN N-SUFFICIENT AND N-LIMITED CYCLOSTAT CULTURES OF <i>ISOCHRYSIS</i> SP.	155
1. Introduction.....	163
2. Materials and Methods.....	165
3. Results	171
3.1 N-sufficient phase	171
3.2 N starvation and recovery phases	175
4. Discussion.....	180
4.1 N and C assimilations in a synchronized population.....	180
4.2 Lipid and TC metabolism in N-sufficient growth under alternative light	182
4.3 Nighttime losses and the role of C reserves in alternative light	185
4.4 TC and neutral lipid metabolism in starvation under L/D cycle.....	186
5. Conclusion	187
VI. RESPONSE OF <i>ISOCHRYSIS</i> SP. GLYCOLIPIDS AND CONSTITUTIVE FATTY ACIDS TO NITROGEN LIMITATION AND LIGHT/DARK CYCLE	189
1. Introduction.....	196
2. Material and methods	198
3. Results	203
3.1 L/D cycle, Experiment 1	203
3.1.1 Physiology: cell growth and division	203
3.1.2 Glycolipid composition	205
3.2 Nitrate limitation: Experiment 2.....	211
3.2.1 Physiology :	211
3.2.2 Glycolipid composition	211
3.2.3 Photosynthetic proteins composition and efficiency parameters.	213
4. Discussion.....	214
VII. DISCUSSION GÉNÉRALE:	221

L'ACCLIMATATION LIPIDIQUE DES ALGUES : ROLE DES TAG ET DES GLYCOLIPIDES	221
1- L'acclimatation aux contraintes du milieu	225
2- La réponse lipidique aux contraintes du milieu : Rappel des résultats obtenus	226
2.1 Les réserves énergétiques des algues	226
2.1.1 Le stockage de réserves	227
2.1.2 La consommation des réserves	229
2.2 Les glycolipides.....	231
3. Les algues pour produire du biocarburant.....	233
3.1 Quota vs. Productivité.....	233
3.2 Le cycle lumineux diurne : un paramètre crucial	236
3.3 La qualité des huiles produites	236
4. Perspectives : La capacité à stocker des lipides : un avantage compétitif ?.....	237
4.1 Influence des lipides sur la croissance.....	237
4.1.1 Dans un environnement non limité, en lumière continue	239
4.1.2 En régime nutritif variable.....	239
4.1.3 En cycle Jour/Nuit	242
4.1.4 Des expériences à réaliser.....	243
4.2 Rôle des réserves dans la flottabilité	244
VIII. BIBLIOGRAPHIE.....	248
IX. ANNEXES.....	259
Annexe 1.....	260
Annexe 2.....	261
Annexe 3.....	264

Liste des principales abréviations utilisées :

Lipides	TAG	Triacylglycérol
	NL	Lipides neutres
	NR lipid	Fluorescence du Nile red
	NR	Nile red
	MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
	DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
	SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
	DAG	Diacylglycérol
	PC	Phosphatidylcholine
	PE	Phosphatidyléthanolamine
	PG	Phosphatidylglycérol
	PI	Phosphatidylinositol
	PS	Phosphatidylsérine
	PA	Acide Phosphatidique
	IP3	Inositol Triphosphate
	FA	Acide gras
	PUFA	Acide gras polyinsaturé (Polyunsaturated fatty acid)
	DHA	22:6 ω 3
	EPA	20:5 ω 3
Composition biochimique	C ou C _c	Carbone
	C _i	Concentration d'un composé <i>i</i>
	N	Azote
	Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
	TC	Sucres totaux
Croissance et activité photosynthétique	μ_i	Taux de croissance spécifique d'un composé <i>i</i>
	P _i	Taux de production ou productivité d'un composé <i>i</i> normalisé par le carbone
	PFD	Densité du flux de photon
	D	Taux de dilution
	P _{max}	Activité photosynthétique normalisée par la chlorophylle <i>a</i> à lumière
	τ	Temps minimum pour qu'un électron produit au niveau du centre réactionnel du <i>PS2</i> soit utilisé pour réduire une molécule de carbone
	RCI	Centres réactionnels du photosystème 1
	RCII	Centres réactionnels du photosystème 2
	Cytf	Cytochrome b6/f

Introduction Générale

Sommaire

1. LES RESERVES ENERGETIQUES DU PHYTOPLANKTON	21
1.1 Influence de l'azote	22
1.2 La photopériode	24
2. LES GLYCOLIPIDES : DES ACTEURS DE LA PHOTOSYNTHESE ?	24
3. LES HUILES DU PHYTOPLANKTON COMME SOURCE DE BIOCARBURANT	27
4. ORGANISATION DU MANUSCRIT	28

Introduction

La couche de mélange océanique est un système particulièrement dynamique dans lequel les cellules phytoplanctoniques sont exposées à d'importantes variations d'intensité lumineuse, d'approvisionnement en nutriment, et de température (Raven and Geider 2003). Les espèces de phytoplancton ont développé différentes stratégies d'acclimatation qui leur permettent d'optimiser la croissance dans ces environnements variables. **La composante lipidique de cette acclimatation est l'objet de cette thèse.**

1. Les réserves énergétiques du phytoplancton

Dans le milieu naturel, la variabilité du flux de photons conduit les cellules phytoplanctoniques à stocker de l'énergie. Les réserves énergétiques permettent aux cellules de s'émanciper temporellement et spatialement d'un apport d'énergie constant, notamment en période de stress (absence de lumière) (Coleman and Lee 2004). Les deux principales formes de réserve du phytoplancton sont les sucres et les triacylglycerols (TAG). Les TAG sont des molécules beaucoup plus denses en énergie que les sucres car très réduites et très hydrophobes : l'oxydation complète d'un TAG a un rendement moyen de 9 kcal.g^{-1} , contre 4 kcal.g^{-1} pour les sucres et les protéines (Berg *et al.* 2003). La manière dont ces deux formes de stockage sont produites, stockées et utilisées est largement contrôlée par les conditions environnementales.

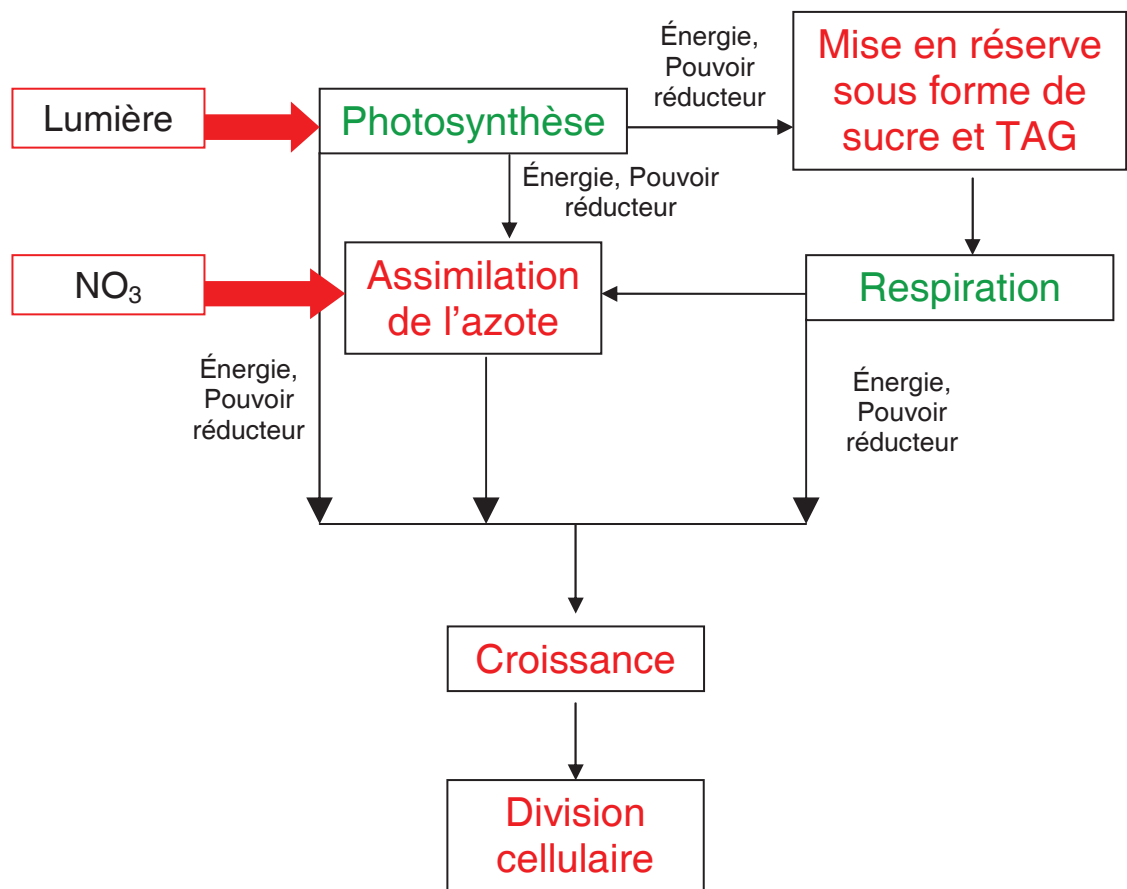


Figure 1 : Représentation schématique des relations fonctionnelles entre les métabolismes de l'azote, du carbone et des réserves énergétiques. La photosynthèse permet de capter l'énergie lumineuse et de la transformer en énergie chimique qui peut être utilisée par la cellule. Dans certaines conditions une partie de l'énergie captée peut être stockée sous forme de sucre et de lipides neutres. L'absorption et l'assimilation de l'azote nécessitent de l'énergie (ATP) et des molécules réductrices (NADPH) provenant de la photosynthèse ou de la respiration des réserves énergétiques de la cellule. La coordination des métabolismes de l'azote et du carbone permet une croissance équilibrée. Les processus qui consomment de l'énergie et des molécules réductrices sont inscrits en rouge. Les processus qui en produisent sont en vert.

1.1 Influence de l'azote

Lorsqu'elles sont associées à des mouvements verticaux (sédimentation, mélanges épisodiques) ou pendant des périodes d'efflorescence printanière (fortes concentrations en azote en début de bloom, faibles pendant le déclin) les cellules phytoplanctoniques font face à des variations brutales de la concentration en azote inorganique. La figure 1 montre les couplages étroits qui existent entre les métabolismes de l'azote et du carbone, et l'importance des réserves énergétiques dans la coordination de ces deux métabolismes dans un environnement physico-chimique fluctuant. Différents auteurs ont montré que la carence en azote provoque une accumulation de lipides et de sucres chez de nombreuses espèces de phytoplancton (Spoehr and Milner 1949, Shifrin and Chisholm 1981, Roessler 1990). Ces accumulations ont souvent été présentées comme le résultat d'un déséquilibre entre les métabolismes de l'azote et du carbone. La synthèse de sucres et de lipides neutres permettrait aux cellules carencées en azote de canaliser les produits de la photosynthèse vers des produits qui ne contiennent pas d'azote (Shifrin and Chisholm 1981).

Pour étudier le caractère non stationnaire ou transitoire de ces phénomènes, nous avons réalisé des expériences de carence azotée dans lesquelles la croissance des algues est déséquilibrée, ainsi que des expériences de limitation en chémostat dans lesquelles la croissance est équilibrée. Pour comprendre la manière dont est régulé le métabolisme de ces réserves et afin de clarifier la relation entre le statut azoté et la teneur en lipides neutres et en sucre d'*Isochrysis* sp., nous avons travaillé sur des mises en carence et en limitation, mais aussi sur des levées totales ou partielles de limitation azotée.

L'objectif premier de cette thèse est de comprendre comment les lipides neutres et les sucres de réserves sont accumulés et consommés dans différentes conditions de limitation azotée (carence, croissance équilibrée en limitation).

1.2 La photopériode

Dans le milieu océanique, l'énergie lumineuse naturelle captée par les microalgues est très variable, notamment à cause de la photopériode. Dans ces conditions, les réserves énergétiques sont susceptibles de jouer un rôle important dans leur croissance (Shifrin and Chisholm 1981, Sukenik and Carmeli 1990, Fabregas and al. 2002). Les cellules doivent accumuler des réserves pendant le jour pour accomplir certains processus physiologiques la nuit (assimilation de nutriments, synthèse de protéines, (Cuhel *et al.* 1984).

Le second objectif de cette thèse est de mieux comprendre le rôle respectif des lipides neutres et des sucres dans la croissance phytoplanctonique sous éclairement photopériodique. Pour étudier les interactions entre ces deux contraintes environnementales, nous avons réalisé des expériences en conditions de croissance non limitée et carencée par l'azote. Ces résultats nous ont permis de mieux comprendre le rôle joué par les réserves énergétiques dans un environnement marin variable.

2. Les glycolipides : des acteurs de la photosynthèse ?

Un autre aspect de l'acclimatation des microalgues aux contraintes environnementales est la modification des lipides qui entrent dans la composition des membranes des chloroplastes. Différents auteurs (Falkowski *et al.* 1989, Herzig and Falkowski 1989, Geider and La Roche 1993, MacIntyre *et al.* 1996, MacIntyre *et al.* 2002) ont montré comment l'activité photosynthétique des cellules phytoplanctoniques répondait à ces contraintes, notamment via des changements de pigmentation, ou des modifications de la synthèse et de l'activité de protéines impliquées dans les phases lumineuses et obscures de la photosynthèse. Par contre, rares sont les études qui se sont penchées sur le rôle des lipides chloroplastiques.

Les premières étapes de la photosynthèse comme l'absorption de la lumière, les réactions photochimiques, le transport des électrons, la synthèse d'ATP ont lieu dans les membranes des thylakoïdes des chloroplastes (Figure 2). Les propriétés de ces membranes sont donc importantes pour de nombreux aspects de la photosynthèse (Wada and Murata 2010). Les membranes des thylakoïdes sont composées de protéines et de glycérolipides. Les protéines photosynthétiques, enchâssées dans des membranes lipidiques, interagissent avec elles. Les changements de proportions des lipides des membranes sont susceptibles de modifier l'activité de ces protéines (Jones 2007).

Certains auteurs ont montré que les conditions environnementales pouvaient modifier la composition lipidique de ces membranes. Des modifications du degré d'insaturation des acides gras en réponse à des changements de température ont été observées chez les plantes supérieures (Routaboul 2000) et les cyanobactéries (Gombos *et al.* 1992). Mock et Kroon ont aussi montré que la limitation en azote (2002a) ou des changements de lumière (2002b) pouvaient modifier la composition lipidique des membranes des thylakoïdes des microalgues.

Le troisième objectif de cette thèse est de déterminer comment les changements de composition des lipides des membranes des thylakoïdes accompagnent les changements de l'activité photosynthétiques des algues dans des environnements variables.

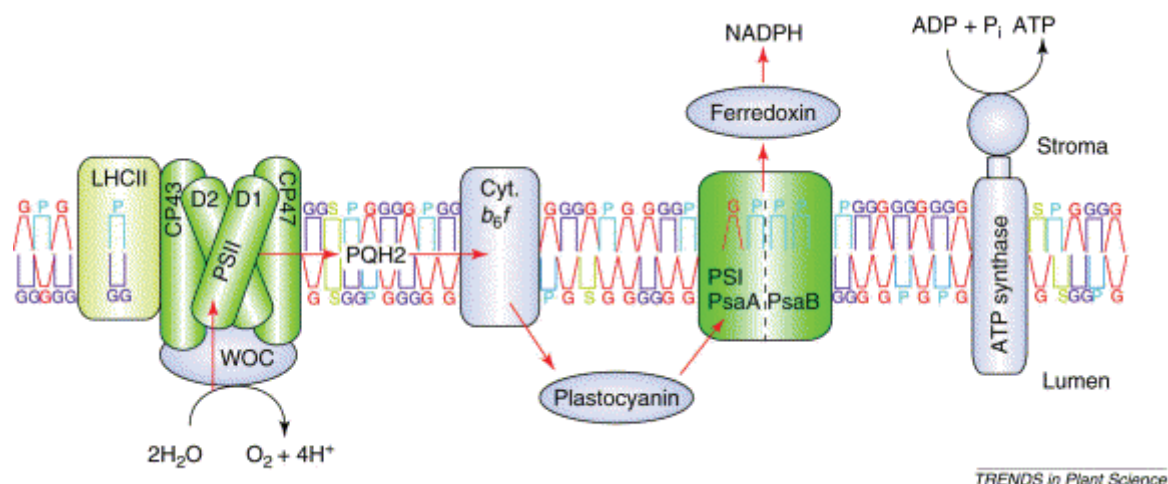


Figure 2 : Représentation schématique des réactions de la phase lumineuse de la photosynthèse dans la membrane des thylakoïdes. Les protéines impliquées dans ces réactions sont en interaction avec les lipides composant cette membrane. Le schéma montre la localisation des différents glycérolipides : le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), rouge; le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), violet; le phosphatidylglycérol (PG), bleu et le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), vert. Abréviations: CP43 et CP47, Antennes de PSII; Cyt. b_6f , cytochrome b_6f ; D1 et D2, sous unités de PSII; PsaA et PsaB, sous unités de PSI. Extrait de Dormann and Benning, (2002).

3. Les huiles du phytoplancton comme source de biocarburant

La capacité de certaines algues à constituer des réserves énergétiques a récemment permis d'imaginer leur utilisation pour produire des biocarburants. En effet, différents auteurs ont suggéré que, de part leurs fortes teneurs en lipides neutres et leur capacité à croître rapidement, certaines espèces de microalgues pouvaient être employées comme des usines cellulaires pour produire des huiles transformables en biodiesel (Sheehan *et al.* 1998, Hu *et al.* 2008). La productivité en huile est l'un des principaux paramètres sur lesquels on peut jouer pour augmenter la viabilité d'une production de biodiesel (Griffiths and Harrison 2008). La productivité en lipide neutre est le produit de la teneur en huile par le taux de production de biomasse. Différentes études ont démontré que la teneur en huile était un mauvais indicateur de la productivité en huile, à la fois au niveau interspécifique que pour une espèce donnée lorsqu'on modifie ses conditions environnementales (Griffiths and Harrison 2008, Rodolfi *et al.* 2009). En effet, les auteurs ont montré que les microalgues accumulaient des lipides neutres dans des conditions de croissance faible, c'est-à-dire lorsque la productivité de la biomasse est faible (Rodolfi *et al.* 2009). Les contraintes environnementales ont donc des effets antagonistes sur la teneur en huile et la productivité de biomasse, rendant leurs effets sur la productivité en huile difficile à évaluer. Rodolfi *et al.* (2009) ont montré qu'une carence en azote pouvait augmenter à court terme la productivité en huile de *Nannochloropsis*. Mise à part cette étude, il existe un réel manque de données sur l'effet des limitations en nutriment à la fois sur la croissance et la teneur en huile.

Le quatrième objectif de ce travail est donc de déterminer l'influence des conditions environnementales sur la productivité en lipides neutres des algues dans différentes

conditions environnementales (carence et limitation, sous éclairage photopériodique ou continu). On pourra ainsi déterminer les conditions environnementales qui maximisent la production de lipides neutres.

4. Organisation du manuscrit

Le chapitre 1 présente l'état des connaissances sur l'acclimatation lipidique du phytoplancton. Après une brève description des différents lipides étudiés, nous montrerons comment la composition des microalgues peut être modifiée par les conditions environnementales.

Le chapitre 2 décrit les différentes méthodes et techniques utilisées dans cette thèse. Nous portons une attention particulière à l'analyse des lipides qui est l'une des spécificités de ce travail.

La première partie du chapitre 3 (article soumis à J. Phycol.) traite de la relation entre le statut azoté et les productivités en huile et en sucre d'une culture d'*Isochrysis* sp. placée dans différentes conditions de limitation azotée. La deuxième section de ce chapitre présente le modèle mathématique qui a été construit à partir des données obtenues.

Le chapitre 4 présente d'abord la composition en acides gras des TAG de différentes espèces d'algues et étudie leur acceptabilité en tant que biocarburant. Dans un deuxième temps, nous étudions l'influence de la carence en azote sur la qualité des huiles produites par *Isochrysis* sp..

Le chapitre 5 (article en préparation pour J. Phycol.,) étudie l'influence des cycles lumineux diurnes sur la physiologie d'*Isochrysis* sp, notamment sur les métabolismes des réserves de lipides et de sucres.

Le chapitre 6 (article soumis à J. Phycol.) qui traite de l'influence de la limitation azotée et de la photopériode sur la composition des glycolipides chloroplastiques. Nous mettons en relation les modifications de composition membranaire avec les modifications des propriétés de la photosynthèse pour montrer le rôle de ces lipides dans la photosynthèse.

Le dernier chapitre résume les différents résultats obtenus et discute leur portée pour la compréhension de l'écophysiologie du phytoplancton, mais aussi dans le contexte de la production de biodiesel. Pour finir nous proposons différentes perspectives écologiques au travail réalisé.

Chapitre 1

I. L'acclimatation lipidique des microalgues en réponse à des changements de conditions environnementales : état des connaissances

Où il sera question :

- Des lipides des microalgues
- De la régulation de leur composition par les contraintes environnementales

Sommaire

1. INTRODUCTION	35
2. LES LIPIDES DU PHYTOPLANCTON	35
2.1 Rappel sur les différents lipides en présence	35
2.1.1 Les principaux lipides des chloroplastes	36
2.1.2 Les lipides des autres membranes	37
2.1.3 Les lipides neutres, des lipides de réserves	37
2.2 Le métabolisme lipidique.....	40
2.3 La composition lipidique des micro-algues eucaryotes.....	45
2.3.1 Teneur en lipides totaux	45
2.3.2 Les différentes classes de lipides.....	45
2.3.3 Les acides gras	46
2.3.4 Variations interclonales	47
3. L'INFLUENCE DU CYCLE CELLULAIRE ET DU CYCLE NYCTHEMERAL SUR LA COMPOSITION LIPIDIQUE	48
3.1 Influence du cycle cellulaire	48
3.1.1 Contrôle du cycle cellulaire par la croissance	49
3.1.2 La composante lipidique de la croissance somatique	51
3.2 Influence du cycle nycthémeral (jour/nuit).....	52
4. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES ET PRODUCTIONS QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LIPIDES	52
4.1. Généralités	53
4.2 Adaptation ou acclimatation ?	54
4.3 Influence de la concentration en nitrate du milieu.....	54
4.3.1 La carence en azote provoque un arrêt de la division cellulaire	54
4.3.2 La carence entraîne une accumulation de triglycérides et de sucres	57
4.3.3 La carence en azote provoque une diminution de l'activité photosynthétique	59
4.3.4 La carence en azote modifie la composition en acide gras des glycérolipides	60
4.4 Influence de la lumière.....	61
4.4.1 Modification des classes de lipides	62
4.4.2 Modification de l'insaturation de ces lipides.....	62
4.5 Influence de la température	63
5. CONCLUSION	64

1. Introduction

Cette partie fournit une description synoptique mais non exhaustive du rôle joué par les différentes classes de lipides dans le métabolisme cellulaire du phytoplancton. Inversement, nous avons recherché comment ces différentes classes pouvaient évoluer en fonction des contraintes du milieu, notamment l'intensité lumineuse, la température et la disponibilité des nutriments. La littérature à ce sujet étant beaucoup plus abondante sur les plantes supérieures, un certain nombre de nos citations y fait référence.

2. Les lipides du phytoplancton

Qu'est ce qu'un lipide ? Les lipides sont des substances hydrophobes (ou amphipatiques) solubles dans les solvants organiques. C'est souvent la présence d'un composant particulier, l'acide gras, qui donne ses propriétés d'hydrophobicité aux lipides. Il existe plusieurs catégories de lipides qui elles-mêmes englobent de nombreux composants aux structures très différentes. On peut dégager plusieurs classes de lipides : les acides gras, les glycérophospholipides (phospholipides), les glycéroglycolipides (ou glycolipides), les sphingolipides, les stérols, les prénoles et les acylglycérols (dont les triglycérides). Dans cette étude, nous nous intéresserons essentiellement aux glycérolipides (phospholipides, glycolipides et triglycérides) qui, comme leur nom l'indique, sont constitués d'un squelette glycérol sur lequel sont estérifiés des acides gras.

2.1 Rappel sur les différents lipides en présence

Glycolipides et phospholipides sont les composants structuraux des membranes. Ils établissent pour la cellule et pour les organites une barrière qui est à l'origine de la complexité de la vie. Ils sont aussi impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires en procurant une matrice pour de nombreux processus catalytiques, en influençant activement les propriétés fonctionnelles des protéines associées aux membranes. Des dérivés de ces lipides sont aussi

des messagers secondaires intracellulaires de première importance (lipides bioactifs : IP3, PA, DAG, etc.). Les **triglycérides** sont des molécules de réserve qui peuvent être catabolisées pour fournir de l'énergie et du pouvoir réducteur aux cellules.

2.1.1 Les principaux lipides des chloroplastes

Les glycolipides du phytoplancton sont localisés dans les membranes des chloroplastes. Les deux glycolipides principaux sont le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) (Figure 1). Leur structure particulière leur confère des propriétés spécifiques. Le MGDG est un lipide qui a tendance à former des structures de type hexagonal II, alors que le DGDG forme plutôt des structures de type bicouche lipidique (Jouhet *et al.* 2007). Le lien entre la structure des lipides et leurs fonctions dans la membrane et dans la cellule sera discuté plus loin (voir aussi Tableau 1). Ce lien est d'une importance cruciale pour comprendre les conséquences des modifications du profil lipidique provoquées par l'apparition de nouvelles conditions environnementales.

Les chloroplastes sont aussi composés de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (Figure 1) qui a tendance à former des bicouches.

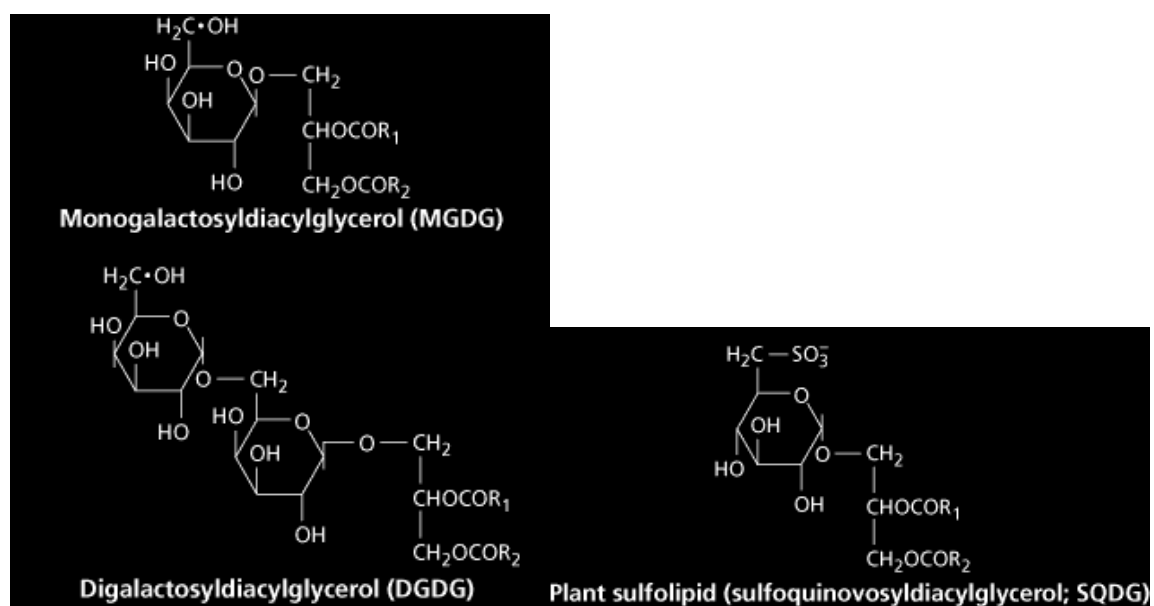


Figure 1 : La structure des glycolipides des chloroplastes. Les galactolipides MGDG et DGDG ne sont pas chargés. Le sulfolipide SQDG est chargé négativement. D'après Harwood (1996).

Les phospholipides prépondérants dans les membranes des chloroplastes sont le phosphatidylglycérol (PG), et la phosphatidylcholine (PC) (enveloppe externe exclusivement). Le PG (lipide anionique) ainsi que la PC ont aussi tendance à former des bicouches.

2.1.2 Les lipides des autres membranes

Les phospholipides sont les composants principaux de toutes les autres membranes de la cellule. En plus de la PC et du PG, on trouve principalement la phosphatidyléthanolamine (PE), lipide neutre (zwitterionique) qui s'organise principalement en structure cristalline hexagonale II, et la phosphatidylserine (PS) (bicouche).

Ces différents lipides ont des formes moléculaires diverses (cylindrique, conique, conique inversée) qui déterminent la structure des membranes. La composition de ces membranes en lipides, mais aussi en protéines, est essentielle pour assurer leurs fonctions (fluidité, perméabilité, insertion des protéines membranaires, etc.). Une modification de la répartition entre ces différents composants entraînera une modification des propriétés des membranes.

2.1.3 Les lipides neutres, des lipides de réserves

Les triglycérides (ou triacylglycérols, TAG) sont les principaux lipides de réserve du phytoplancton. Ils sont stockés sous forme de petites gouttelettes dans le cytosol et sont parfois observés dans les chloroplastes (plastoglobuli) de la cellule (Liu and Lin 2001) (Photo 1).

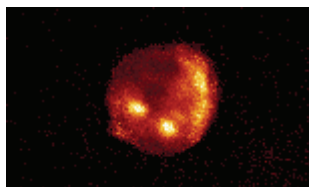


Photo 1 : Cellule d'*Isochrysis* sp. marquée au Nile red et observée au microscope confocal du LOV. Le Nile red fluoresce dans le jaune dans les environnements les plus apolaires (triglycérides) et dans le rouge dans les environnements plus polaires (membranes).

Comme pour de nombreux organismes, les triglycérides des microalgues eucaryotes sont des réserves de carbone et d'énergie qui peuvent être mobilisées quand la croissance est stimulée (Murphy 2001). Les TAG sont alors β -oxydés pour produire de l'ATP par respiration, ainsi que des molécules réductrices qui sont utilisées pour la synthèse de composés nécessaires à la croissance (protéines, sucres, glycérolipides par synthèse *de novo*, etc.). Par exemple, l'oxydation complète d'une molécule telle que le palmitate (C16) génère 106 molécules d'ATP (Berg *et al.* 2003). Ce sont des réserves énergétiques extrêmement denses (ils sont réduits et anhydres). Un gramme de triglycéride contient environ 6 fois plus d'énergie qu'un gramme de glycogène hydraté (polysaccharide qui sert aussi de stockage).

De récentes études ont montré que les triglycérides n'étaient pas seulement des produits finaux de l'anabolisme lipidique mais qu'ils pouvaient aussi constituer des intermédiaires dans la biosynthèse des glycolipides et phospholipides membranaires (Khozin-Goldberg *et al.* 2000). Des expériences de marquage au ^{14}C sur *Porphyridium cruentum* ont montré que les acides gras étaient d'abord intégrés aux TAG pour être ensuite distribués vers les lipides polaires des autres compartiments cellulaires. Dans certaines conditions de croissance (reprise de la division cellulaire après une phase de carence nutritive, par exemple) et pour certaines espèces de phytoplancton, les glycérolipides membranaires peuvent être en partie assemblés à partir des acides gras des TAG. Certains acides gras importants fonctionnellement (certains PUFA) stockés dans de fortes proportions dans les TAG ne sont pas dégradés lors de la

reprise de la croissance, mais réutilisés pour fabriquer de nouvelles membranes (Khozin-Goldberg *et al.* 2005).

Les microalgues marines évoluent dans un environnement variable dont les multiples modifications à court terme (salinité, température, disponibilité en nutriments et en photons) peuvent induire une adaptation et une réorganisation des membranes. Les gouttelettes lipidiques de TAG sont vraisemblablement des systèmes tampons internes qui peuvent fournir rapidement des groupes acyles spécifiques (EPA, DHA) susceptibles de modifier et/ou de stabiliser les membranes dans un environnement variable.

Tableau 1 : Localisation et types de membranes formées par les principaux glycérolipides

Lipide	Type de membrane formée	Localisation dans la cellule
MGDG	Hexagonal II	Thylakoïdes
DGDG	Bicouche	Thylakoïdes
SQDG	Bicouche	Thylakoïdes
PG	Bicouche	Chloroplastes
PC	Bicouche	Toutes les membranes
PE	Bicouche	Toutes membranes sauf chloroplastes
PS	Hexagonal II	Toutes membranes sauf chloroplastes

2.2 Le métabolisme lipidique

La composition des différentes membranes cellulaires diffère significativement suivant leur fonction (enveloppe des chloroplastes, thylakoïdes, réticulum endoplasmique). Les lipides sont synthétisés dans divers compartiments de la cellule. La cellule dispose de mécanismes permettant un transport des différentes classes de lipides qui régule leur composition au sein des différents compartiments. Les voies de synthèse des différents lipides sont donc hautement intégrées.

Les lipides membranaires sont essentiellement des glycérolipides composés d'un squelette tricarboné (glycérol) sur lequel sont estérifiés deux acides gras en position sn-1 et sn-2 et une tête polaire en position sn-3 (Figure 2).

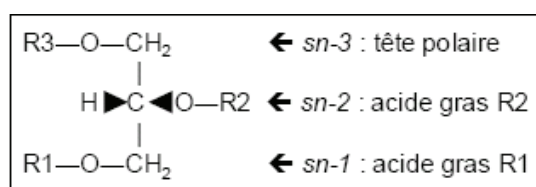


Figure 2 : Schéma d'un glycérolipide

Chez les plantes supérieures, les acides gras sont synthétisés dans les chloroplastes sous la forme d'acyl-ACP par un complexe enzymatique appelé FAS (Fatty Acid Synthase). Les produits finaux sont principalement le 16:0-ACP et le 18:0-ACP. Le 18:0 est désaturé en 18:1-ACP. Ensuite 16:0 et 18:1 peuvent être estérifiés au glycérol-3-phosphate pour former de l'acide phosphatidique (PA) ou être hydrolysés pour produire des acides gras libres (Figure 3). Ces derniers sont estérifiés au coenzyme A (CoA), puis transportés dans le cytoplasme où ils peuvent être estérifiés au PA (Koo *et al.* 2004). La Figure 3 présente un résumé de la synthèse des glycérolipides avec les différentes enzymes impliquées.

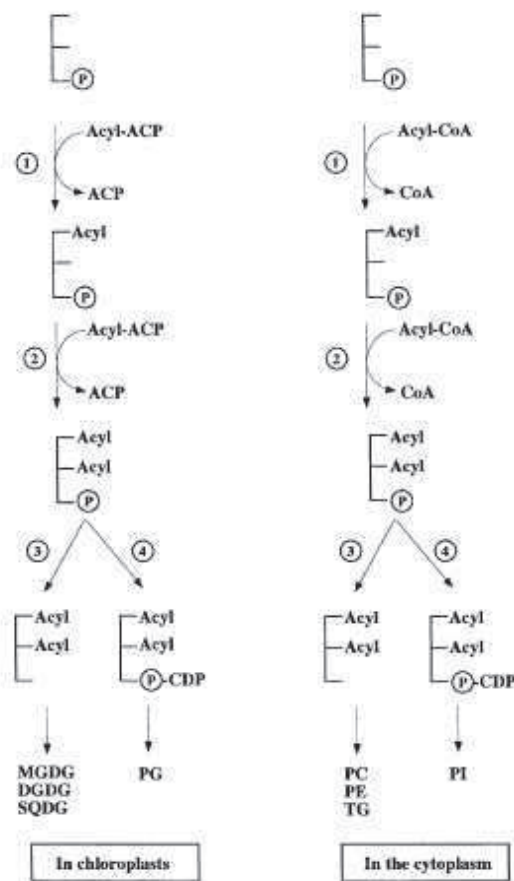


Figure 3 : Les réactions de transfert d'acyl dans les chloroplastes et dans le cytoplasme des plantes. (1) glycérol-3-phosphate acyltransférase, GPAT ; (2) 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase ; (3) phosphatidate phosphatase ; (4) phosphatidate cytidyltransferase. D'après Murata et Tasaka (1997).

Les glycérolipides synthétisés dans le cytoplasme (glycérolipides de structure eucaryote) estérifient un acide gras en C18 en position sn-2 alors que ceux des chloroplastes (lipides « procaryotes ») estérifient des acides gras en C16 (Figure 4). En position sn-1, des acides gras en C16 et en C18 sont présents quel que soit leur site de synthèse. Cette distribution suggère que les GPAT des chloroplastes et du cytoplasme ont une faible spécificité avec leur substrat. Au contraire, la 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase du cytoplasme reconnaît spécifiquement les acides gras en C18 alors que celle des chloroplastes reconnaît spécifiquement les acides gras en C16 (Murata and Tasaka 1997).

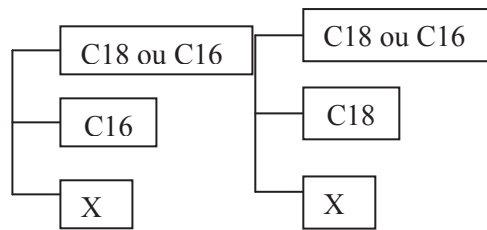


Figure 4 : Lipide de structure procaryote synthétisé dans les chloroplastes (a gauche) et de structure eucaryote synthétisé dans le cytoplasme (a droite)

Les principaux phospholipides trouvés dans les tissus végétaux ont une structure type eucaryote, excepté pour le PG plastidial. La synthèse des phospholipides est communément séparée en 3 voies : les phospholipides dérivés du cytidine diphosphate (CDP)-DAG, ceux dérivés du DAG, et ceux provenant d'échange de têtes polaires appartenant à d'autres phospholipides (Jouhet *et al.* 2007). Le DAG, de structure eucaryote ou procaryote, est le précurseur de la synthèse des glycolipides (SQDG, MGDG et DGDG). Il existe donc deux types de glycolipides : le type procaryote dont le squelette DAG provient des plastes, et le type eucaryote dont le DAG est issu de la PC. La synthèse des glycolipides, étant localisée dans les membranes de l'enveloppe des plastes, requiert donc un mécanisme d'import du DAG de type eucaryote.

La MGDG synthase transfère un galactose sur un DAG. Il existe plusieurs homologues de cette enzyme qui présentent des affinités différentes pour les substrats (origine eucaryote ou procaryote) (Awai *et al.* 2001), et qui sont activés différemment en fonction des conditions environnementales. C'est une des voies de réponse de la composition des membranes aux variations de conditions environnementales. Il existe aussi différents homologues de la DGDG synthase, qui ajoutent un galactose au MGDG. Ces homologues sont également

spécifiques d'un substrat, et interviennent dans la régulation de la composition des membranes.

L'acylation des diacylglycérols (DAG) par un acyl CoA par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) était jusqu'à récemment considérée comme la seule voie de synthèse de triacylglycérols (TAG). De nouvelles enzymes de la synthèse des TAG qui catalysent la transacylation de groupes acyles des phospholipides et des DAG vers les TAG ont été décrites (Stobart *et al.* 1997, Stahl and al. 2004), et semblent intervenir de manière très significative dans la synthèse de TAG. Les TAG sont essentiellement des structures du type eucaryote.

Tableau 2 : Teneur en lipide de 10 espèces de phytoplancton.

Espèce	Lipide (% poids sec)	Références
<i>Scenedesmus</i> sp. (Chlorophyceae)	12-40	(Sheehan <i>et al.</i> 1998)
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Chlorophyceae)	20	(Sheehan <i>et al.</i> 1998)
<i>Chlorella</i> sp. (Chlorophyceae)	28-32	(Chisti 2007)
<i>Neochloris oleoabundans</i> (Chlorophyceae)	35-54	(Chisti 2007)
<i>Dunaliella salina</i> (Chlorophyceae)	14.4	(Huntley and Redalje 2007)
<i>Prymnesium</i> sp. (Haptophyceae)	22-38	(Sheehan <i>et al.</i> 1998)
<i>Porphyridium</i> sp. (Rhodophyceae)	9-14	(Sheehan <i>et al.</i> 1998)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Bacillariophyceae)	20-30	(Chisti 2007)
<i>Spirogyra</i> sp. (Charophyceae)	11-21	(Sheehan <i>et al.</i> 1998)
<i>Isochrysis</i> (tahitian) (t-iso) (Prymnesiophyceae)	28.5	(Sheehan <i>et al.</i> 1998)

2.3 La composition lipidique des micro-algues eucaryotes

La composition lipidique des algues eucaryotes est dorénavant bien connue chez un grand nombre d'espèces. Ces études ont commencé il y a environ 50 ans grâce au développement de différentes techniques, et notamment de la chromatographie gazeuse qui nous a renseignés sur la composition en acides gras des différents lipides. Ces études ont souvent été motivées par l'importance des organismes phytoplanctoniques en aquaculture. Il s'agissait de déterminer leurs qualités nutritives dans le but de sélectionner les plus appropriées pour chaque type d'élevage. On s'est notamment intéressé à la teneur en triglycérides (haute valeur énergétique) et en acide gras polyinsaturés (acides gras essentiels).

2.3.1 Teneur en lipides totaux

La teneur lipidique est connue pour un grand nombre d'espèces. Les lipides constituent environ 10 à 40% du poids sec d'une algue en phase de croissance. On observe donc des différences interspécifiques importantes (Tableau 2).

Malgré le grand nombre d'études conduites dans ce domaine, seul un très faible pourcentage des milliers d'espèces connues a été analysé. Comme nous le verrons (voir Chapitre 5), la teneur en lipide des microalgues dépend de leurs conditions de croissance, ce qui rend difficile la comparaison entre les études.

2.3.2 Les différentes classes de lipides

La teneur en classe de lipide des microalgues est assez peu connue. Glycolipides et phospholipides ont une teneur corrélée à la taille de la cellule et à l'abondance de ses organites. Comme nous le verrons en 3, la teneur en lipide neutre dépend beaucoup des conditions environnementales. Les différentes espèces se distinguent surtout par leur capacité à emmagasiner des triglycérides en période de stress.

2.3.3 Les acides gras

La composition en acides gras du phytoplancton dépend de l'espèce étudiée et, comme pour les classes de lipides, des conditions environnementales. Les spectres d'acide gras de nombreuses espèces sont connus (Kates 1970, Thompson *et al.* 1990, Viso and Marty 1993). Certaines classes du phytoplancton ont des compositions très caractéristiques. Par exemple, les diatomées (Bacillariophyceae) sont riches en 16:1 ω 7, 16:0, 20:5 ω 3 et 16-PUFA (Orcutt 1973, Opute 1974, Mayzaud *et al.* 1989, Viso and Marty 1993). Les Dinophycées sont souvent caractérisées par de forts taux de 16:0, 22:6 ω 3, 20:5 ω 3 et 18:4 ω 3 (Mansour *et al.* 1999), et par la présence de 18:5 ω 3 (Joseph 1974, Mayzaud and Ackman 1976). Les acides gras les plus communs chez les Prymnésiophycées (Haptophyceae) sont peu saturés : 14:0, 16:0, 18:1 ω 9. Les chlorophycées possèdent majoritairement du 16:0, 18:3 ω 3 et 16:3 ω 4. L'absence de 20:5 ω 3 et de 22:6 ω 3 dans cette classe de phytoplancton a été utilisée comme marqueur spécifique, car le phytoplancton marin est justement connu pour avoir des taux élevés d'acides gras polyinsaturés essentiels.

On trouve de forts taux de polyinsaturés estérifiés sur les glycolipides pour la plupart des microalgues eucaryotes (Khozin-Goldberg *et al.* 2002). Les glycolipides, constituants des membranes des chloroplastes, ont un rôle structurel et fonctionnel important dans les photosystèmes et les réactions photosynthétiques (Dörmann and Benning 2002, Goss and Wilhelm 2010). Les acides gras polyinsaturés, qui confèrent à la membrane sa fluidité, semblent également être d'une importance cruciale pour le bon fonctionnement des enzymes impliquées dans la photosynthèse (Jones 2007). Les glycolipides sont les lipides qui ont le taux d'insaturation le plus important. Les lipides neutres (TAG) sont généralement peu insaturés même si certaines espèces particulières contiennent des TAG très riches en acides gras polyinsaturés (Khozin-Goldberg *et al.* 2000, Khozin-Goldberg *et al.* 2005).

En plus des différences interspécifiques, il faut noter de fortes différences intraspécifiques. On observe en effet des différences importantes de composition lipidique d'une étude à l'autre. Comme nous le verrons plus loin, les conditions expérimentales (pendant mais aussi avant l'expérience : « histoire » de la culture) ont une influence majeure sur la composition lipidique d'une cellule de phytoplancton.

2.3.4 Variations interclonales

Bien que chaque espèce de phytoplancton possède une composition lipidique particulière, il a été montré que des différences importantes existaient entre les souches d'une même espèce, différences que l'on peut attribuer à des diversifications génétiques. On a par exemple pu montrer qu'il existait une grande variabilité phénotypique, notamment pour le taux de croissance, la quantité de lipide ou la composition en acide gras. A partir d'une même souche « mère », Liang *et al.* (2005) ont mis en culture 60 clones (isolés à partir d'1 cellule unique) dans des conditions identiques; les différentes populations issues de ces clones se sont avérées avoir des compositions lipidiques et des taux de croissance très différents. Par ailleurs, les mesures de lipides que nous avons pu faire au cytomètre en flux sur des populations de cellules marquées au Nile red montrent la grande variabilité entre les individus d'une même population d'algue (Figure 5). Cette variabilité, imputable à des différences génétiques, peut aussi être due à des différences de positionnement des organismes dans leur cycle cellulaire (voir 2.). La plasticité phénotypique des algues (capacité d'un génotype à produire différents phénotypes) explique sans doute une grande part de la variabilité des résultats de la littérature.

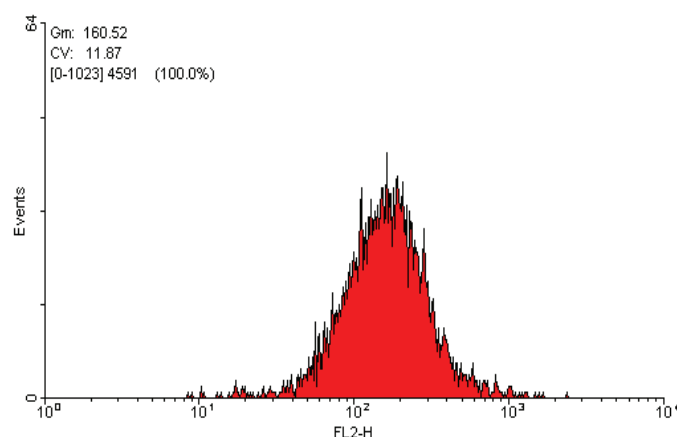


Figure 5 : Répartition d'une population de cellules d'*Isochrysis* sp. en fonction de la concentration intracellulaire en lipides (FL2, intensité relative de fluorescence). La population de cellules analysée était soumise à un éclairage continu et n'était pas synchronisée. L'absence de synchronisation se caractérise par des positionnements dans le cycle cellulaire différents pour chaque cellule.

3. L'influence du cycle cellulaire et du cycle nycthéméral sur la composition lipidique

3.1 Influence du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases par lesquelles une cellule passe entre deux divisions successives. La viabilité d'une population de cellules dépend du degré de coordination entre croissance somatique et division de ses individus (Tapon *et al.* 2001). L'influence du cycle cellulaire sur la synthèse de lipides des microalgues a été peu étudiée. Les techniques de cultures synchronisées, ainsi que les méthodes de cytométrie en flux, permettent désormais d'étudier ce paramètre. Les levures sont depuis longtemps des organismes modèles pour l'étude du cycle cellulaire, et de ses régulations. La plupart des informations à ce sujet proviennent donc de l'étude de ces organismes, mais il semble que les

mécanismes moléculaires liés au cycle cellulaire soient très bien conservés et très similaires dans tous les organismes eucaryotes (Vaulot 1994).

3.1.1 Contrôle du cycle cellulaire par la croissance

La croissance de la cellule est le résultat de la synthèse de macromolécules (protéines, lipides, polysaccharides, ADN). Certaines études suggèrent que les transitions entre les phases du cycle cellulaire (G1/S, G2/M, etc.) sont régulées par la croissance à travers la composition biochimique des cellules (Tapon *et al.* 2001). Un point de contrôle connu est l'entrée en phase S (réplication de l'ADN) qui serait contrôlée par la quantité de protéines intracellulaires ou par son taux de synthèse (« dosée » par la concentration en cycline qui est proportionnelle à la teneur totale en protéine) (Polymenis and Schmidt 1997). La teneur en sucre et en lipide pourrait avoir des effets analogues sur la progression du cycle cellulaire (Tapon *et al.* 2001)(Figure 6). En effet, si on inhibe la synthèse de lipides en G1, on provoque un arrêt de la division cellulaire, alors que si on l'inhibe en G2 le cycle cellulaire poursuit sa progression (Kwok and Wong 2005). Par ailleurs, la synthèse de lipides se poursuit si l'on bloque la division cellulaire (c'est ce qui se passe lorsque les cellules sont carencées en azote ou lorsqu'on bloque la synthèse d'ADN). Il a été suggéré l'existence d'un mécanisme qui évaluerait (comme pour les protéines) la quantité de lipides, la quantité d'un composant spécifique ou encore la synthèse de lipides en elle-même, qui doit être suffisante pour entrer en phase S.

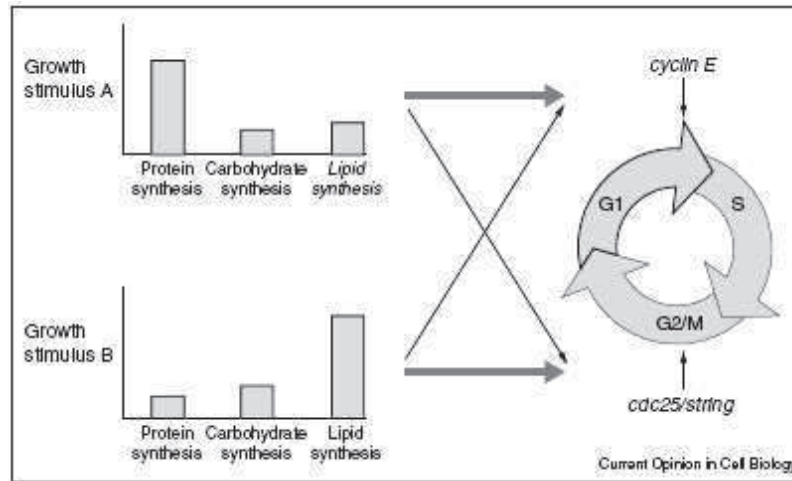


Figure 6 : Modèle spéculatif de Tapon *et al.* (2001) pour expliquer comment différents stimuli peuvent avoir des effets différents sur les transitions du cycle cellulaire. Dans ce modèle, les stimuli environnementaux déterminent la composition en macromolécules (sucre, lipide, protéine) qui elle-même contrôle certaines transitions du cycle cellulaire. Dans cet exemple, le stimulus A favorise la production de protéines alors que le stimulus B favorise l'accumulation de lipides. Ces 2 profils de croissance favorisent l'expression de différents régulateurs du cycle cellulaire (ex : la cycline E, régulatrice de la transition G1/S le string, régulateur de la transition G2/M), entraînant des différences de croissance de la population de cellule. D'après Tapon *et al.* (2001).

3.1.2 La composante lipidique de la croissance somatique

La teneur lipidique et la taille des cellules augmentent au cours de leur croissance, et lorsque celles-ci ont accumulé assez de matériel, notamment membranaire, elles peuvent se diviser. Si on assimile la cellule à une sphère, la quantité de lipides (polaires) constitutifs de la membrane externe doit être théoriquement multipliée par 1,6 pour un doublement de volume. Chez l'espèce de dinoflagellé *Cryptothecodinium cohnii*, la quantité de lipides polaires est multipliée par 1,7, alors que la quantité de lipides neutres est multipliée par 1,8 (Kwok and Wong 2005). Cette même étude a montré que l'augmentation est continue pour les lipides neutres, et discontinue pour les lipides polaires (synthèse réduite en phase S).

Plusieurs questions restent en suspens : la division cellulaire entraîne-t-elle seulement la partition du pool de triglycérides entre les deux cellules filles, ou bien est-elle également accompagnée d'une consommation de triglycérides (apport d'énergie utilisable pour la division)? Y-a-t-il des phases de production de lipides au cours du cycle cellulaire ? Comment est modifiée la composition des différentes membranes cellulaires au cours du cycle cellulaire ? Ces aspects ont été peu traités.

Les études réalisées sur le métabolisme des lipides en lien avec le cycle cellulaire des microalgues sont peu nombreuses et portent sur des cultures synchronisées. Une des méthodes pour obtenir ce type de cultures consiste à les soumettre à des conditions environnementales cycliques (cycle lumineux jour/nuit) dont les effets sont difficilement dissociables du cycle cellulaire en lui-même. En 1981, Shifrin and Chisholm tentent de séparer les effets du cycle jour/nuit et du cycle cellulaire. Pour cela ils synchronisent une culture par un cycle jour/nuit puis la soumettent à un régime continu. Les cellules restant en phase pendant une génération, il devient possible de suivre l'évolution de la concentration en

lipides « indépendamment » du cycle jour/nuit. Mais l'indépendance de ces variations vis-à-vis du cycle jour/ nuit ne paraît pas démontrée. Une autre possibilité serait de synchroniser la culture par des agents chimiques (nocodazol) qui ont peu de chance d'avoir un effet sur le métabolisme des lipides, auquel cas, seuls les effets inhérents au cycle cellulaire pourraient être observés.

3.2 Influence du cycle nycthéral (jour/nuit)

On peut obtenir des cellules de phytoplancton synchrones en les soumettant à des cycles jour/nuit qui rythment simultanément pour toutes les cellules les processus dépendant directement et indirectement de la lumière. Encore une fois, peu d'études ont traité cet aspect. Sukenik and Carmeli (1990) ont montré qu'en plus de contrôler la division cellulaire, le cycle jour/nuit contrôle la production de protéines, de sucres, et de lipides au même titre que la concentration en pigments, la structure ou l'activité de l'appareil photosynthétique. Ils montrent que pendant le jour, sucres, protéines et lipides sont produits. L'une des enzymes principales de la synthèse d'acide gras (AcetylCoA carboxylase) est ATP dépendante et serait affectée par les faibles concentrations d'ATP intracellulaire pendant la nuit. Par marquage radioactif, ils montrent également que la synthèse d'acides gras est en effet stoppée pendant la nuit. C'est donc théoriquement en fin de journée que l'on mesure les plus grandes quantités de lipides (et de triglycérides) (Fábregas *et al.* 2002). De futures études devront confirmer ces résultats.

4. Conditions environnementales et productions qualitative et quantitative de lipides

On sait depuis longtemps que les conditions environnementales peuvent influencer la composition biochimique des microalgues (Spoehr and Milner 1949). Cette propriété peut être utilisée pour favoriser la production de certaines molécules d'intérêt. Dans cette optique, la

compréhension des mécanismes de la régulation par les conditions environnementales de la fixation du carbone et de sa partition entre les différentes molécules organiques (protéines, sucres, lipides membranaires, triglycérides) est cruciale. Dans ce chapitre, nous tenterons de comprendre comment est modifié le profil lipidique du phytoplancton lorsque les conditions environnementales (lumière, nitrate, température) changent.

4.1. Généralités

Chez la plupart des espèces phytoplanctoniques, des conditions de croissance optimales favorisent la production des lipides structuraux (phospholipides, glycolipides) au détriment des lipides de réserve. Inversement, les études ont montré que les triglycérides et les sucres sont accumulés dans des conditions environnementales qui engendrent une croissance faible (Murphy 2001, Guschina and Harwood 2006).

Les conditions de croissance affectent les compositions lipidiques et protéiques spécifiques aux différents types de membranes, et par voie de conséquence, leurs propriétés. On a montré que les cellules végétales, soumises à des conditions de croissance variables (changements environnementaux, mutations affectant la synthèse lipidique, infection virale, etc.) sont capables de préserver l'intégrité de leurs fonctions membranaires. Bien que les mécanismes intimes qui régissent ce que l'on peut appeler « l'homéostasie membranaire » restent mal connus, des mécanismes de régulation de certaines propriétés fondamentales des membranes ont été identifiés:

- la fluidité (qui est intimement liée à la perméabilité) dépend de la longueur et de l'insaturation des chaînes grasses et de la présence de certains lipides (cholestérol, sphingolipides)
- la capacité à interagir avec les protéines membranaires en modifiant leur conformation (capacité à « accueillir des protéines », à les réparer, à modifier leur activité, etc.)

- La capacité à supporter des stress physiques (maintien de la structure quand la salinité change par exemple)

4.2 Adaptation ou acclimatation ?

Il faut différencier deux phénomènes qui peuvent être responsables des modifications lipidiques induites par des changements de conditions environnementales : l'adaptation et l'acclimatation. L'acclimatation se traduit par des changements phénotypiques souvent réversibles, de nature physiologiques, biochimiques et anatomiques. L'adaptation se traduit par une évolution lente, et la plupart du temps irréversible, du génotype sur un grand nombre de générations en réponse à une pression naturelle. Des mutations ponctuelles, des réarrangements intra-génomiques, ou des transferts horizontaux (reproduction) sont sélectionnés en fonction de l'avantage évolutif qu'ils génèrent. Pour les espèces comme celles du phytoplancton qui ont des temps de génération très courts, il est parfois difficile de déterminer le type de modification (génotypique ou phénotypique) qui est mis en jeu dans la réponse à une contrainte.

4.3 Influence de la concentration en nitrate du milieu

Les formes d'azote inorganique et organique les plus communément utilisées par le phytoplancton sont le nitrate, le nitrite, l'ammonium d'une part, les acides aminés et l'urée d'autres part (Lavin and Lourenço 2005). L'absorption des nitrates à travers la membrane plasmique est assurée par un transport actif. L'assimilation de l'azote suit ensuite une séquence de réactions enzymatiques réductrices précédant la synthèse d'acides aminés, point de jonction avec le métabolisme photosynthétique.

4.3.1 La carence en azote provoque un arrêt de la division cellulaire

L'azote intracellulaire se répartit en une diversité de molécules organiques (acides aminés, peptides, protéines de structure ou enzymatique, acides nucléiques, chlorophylle, etc.) et

inorganiques (nitrate, nitrite, ammonium). Le phytoplancton peut accumuler de l'azote sous forme d'azote inorganique (parfois en quantité importante dans des vacuoles) ou sous d'autres formes plus ou moins réduites - acides aminés libres, pigments (notamment la phycoérythrine chez les cryptophytes et la chlorophylle), enzyme (Rubisco) - lesquelles peuvent être catabolisées pour satisfaire la demande en azote d'autres voies métaboliques plus prioritaires lorsque l'azote devient limitant. En période de carence, les cellules consomment d'abord les réserves d'azote inorganique puis les acides aminés libres, une part des protéines puis enfin l'ARN (Lavin and Lourenço 2005). Le mécanisme par lequel une limitation en azote entraîne un ralentissement de la division cellulaire et de la croissance est assez complexe. En période de carence prolongée, l'azote d'une partie des protéines cellulaires (dégradation différentielle) est recyclé (activation de protéases) et la synthèse de protéines diminue. Cette diminution de la croissance cellulaire est « dosée » par une cycline (Polymenis and Schmidt 1997, Tapon *et al.* 2001) qui entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (voir précédent paragraphe sur le cycle cellulaire et Alberghina *et al.* (2004)).

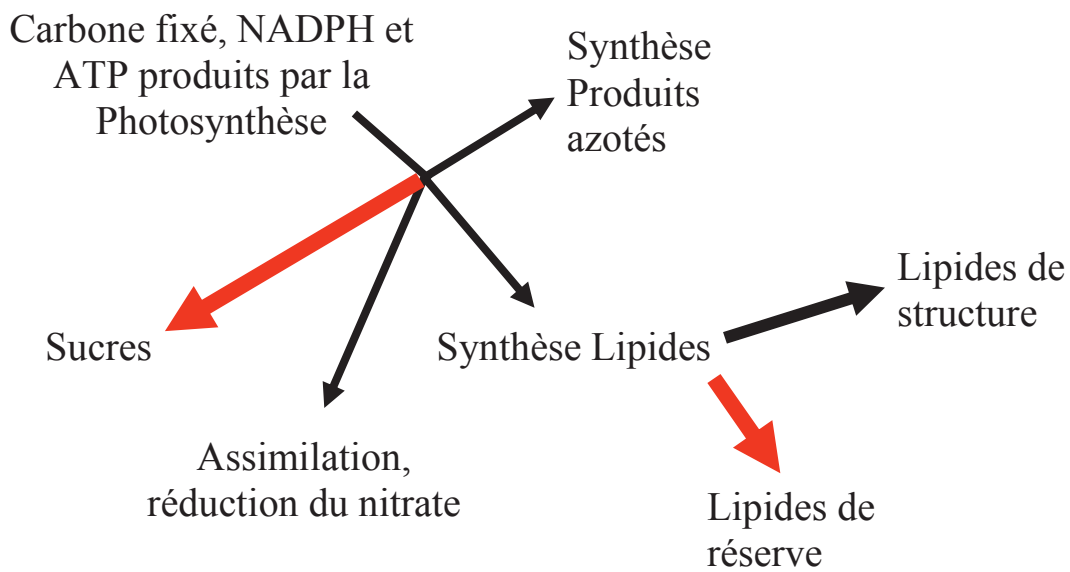


Figure 7 : Schéma représentant les voies générales de répartition des produits de la photosynthèse. Les flèches rouges représentent les voies de dérivation préférentielles des produits de la photosynthèse vers des formes de réserve à la suite d'une carence en azote.

4.3.2 La carence entraîne une accumulation de triglycérides et de sucres

La photosynthèse comprend d'une part les réactions photochimiques (phase claire) par lesquelles l'énergie lumineuse captée par les pigments est transformée en ATP et en NADPH (une molécule à fort pouvoir réducteur), et d'autre part les réactions du cycle de Calvin (phase sombre) qui utilisent le produit des réactions photosynthétiques (photosynthates) pour réduire le carbone inorganique et synthétiser des molécules organiques carbonées. Les phases claire et sombre de la photosynthèse sont équilibrées afin d'optimiser l'utilisation des photons absorbés par le cortège pigmentaire.

En régime de croissance équilibrée - une croissance équilibrée se réalise dans des conditions de croissance constantes et se caractérise par des compositions en macromolécules constantes- les voies d'assimilation de l'azote et du carbone sont régulées pour fonctionner à des taux équivalents, de sorte qu'aucune de ces deux formes ne s'accumule de façon excessive par rapport à l'autre dans la cellule. Lorsqu'une limitation par l'azote apparaît, les produits de la photosynthèse ne sont plus orientés vers la croissance somatique de la cellule (lipides et protéines de structure, enzymes, pigments, ADN), mais vers la synthèse de lipides neutres (triglycérides de réserve) et de polymères de sucres (Figure 7). On assiste donc souvent à une accumulation de sucres et de triglycérides dans les cellules carencées en nitrate, tant que leur croissance est de type déséquilibrée (métabolisme du carbone supérieur à celui de l'azote). Avec le temps, le taux d'assimilation du carbone va également décroître, et l'accumulation de réserves carbonées se stabiliser.

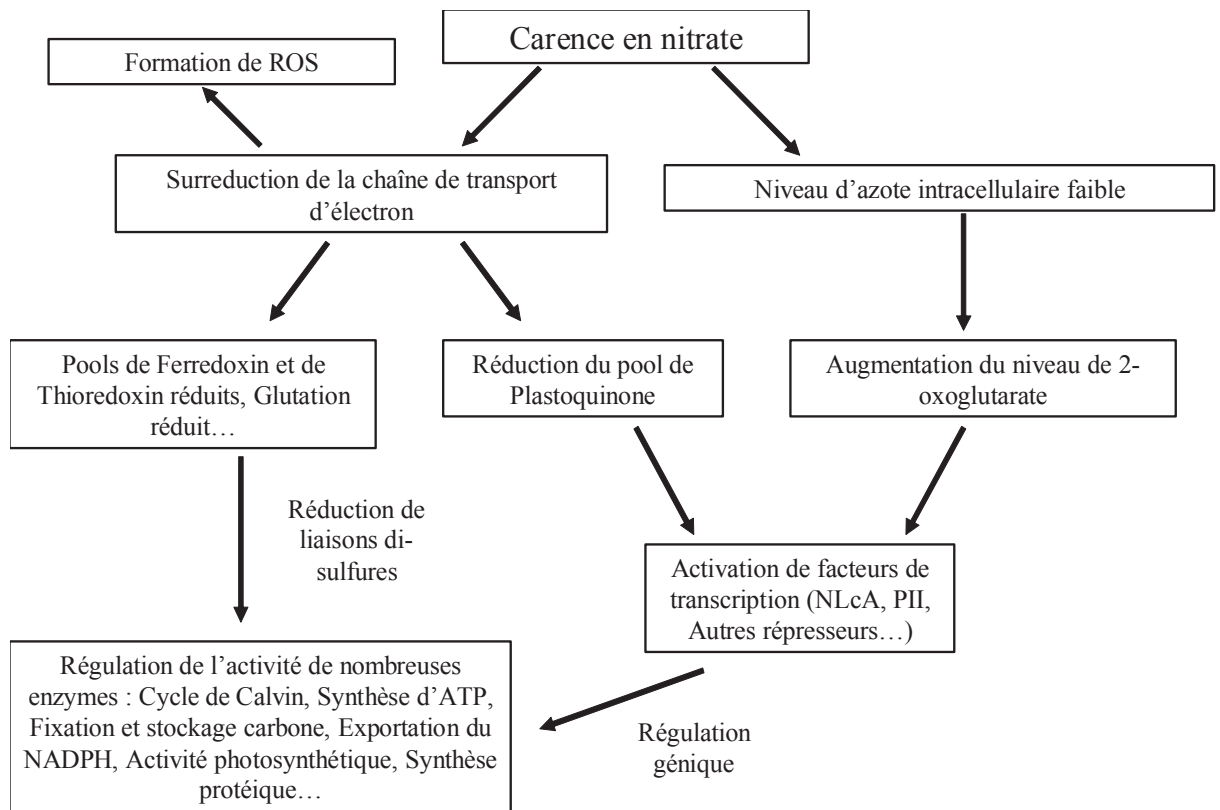


Figure 8 : Schéma simplifié de la régulation du métabolisme par une carence en nitrate. ROS : Reactive oxygen species.

4.3.3 La carence en azote provoque une diminution de l'activité photosynthétique

La carence en nitrate entraîne par l'intermédiaire de l'augmentation du 2-oxoglutarate la synthèse de facteurs de transcription (NtcA, PII ...) qui diminuent la synthèse de protéines photosynthétiques, ribosomales et de protéines impliquées dans la fixation du carbone et de l'assimilation des nitrates (Tolonen *et al.* 2006) (Figure 8). Les signaux redox générés par la chaîne de transport des électrons sont aussi connus pour être impliqués dans la régulation du cycle de Calvin, de la synthèse d'ATP, de l'exportation du NADPH hors du chloroplaste et de la synthèse *de novo* d'acides gras. Le système thioredoxin-ferredoxin lorsqu'il est réduit (en état carencé, ce système est fortement réduit) régule l'activité de certaines enzymes (impliquées dans la photosynthèse) en réduisant certaines de leurs liaisons disulfides. C'est une des voies de régulation connues à l'heure actuelle. Les niveaux d'oxydation du pool de plastoquinone sont aussi connus pour réguler la synthèse de certaines protéines photosynthétiques (Durnford and Falkowski 1997). Ainsi, en plus de son rôle traditionnel dans la transduction de l'énergie, l'appareil photosynthétique apparaît comme étant un senseur de l'environnement.

Ces différentes régulations provoquent un ralentissement important de la fixation de carbone inorganique (Turpin 1991) lorsque les cellules sont limitées par l'azote. Les taux d'accumulation de lipides s'en trouvent donc probablement affectés. De plus, Livne and Sukenik (1992) ont montré que l'activité *in vitro* de l'acetylCoA Carboxylase (ACCase) d'*Isochrysis galbana*, une enzyme clé de la régulation de la synthèse d'acide gras, décroît lors d'une carence azotée.

La carence azotée provoque donc une redirection du carbone issu de la photosynthèse vers des molécules de réserve (lipides neutres, sucres) mais dans le même temps, une diminution de l'activité photosynthétique et de la synthèse de lipide. Les accumulations de lipides neutres et

de sucres en réponse à des carences azotées décrites par différents auteurs apparaissent donc comme étant le fruit d'un déséquilibre métabolique qui n'est que transitoire et qui s'atténue avec le temps. Lorsqu'on étudie l'accumulation des macromolécules de réserve (lipides, sucres), il est donc essentiel de prendre en compte la dimension « dynamique » du phénomène.

Les interactions entre les métabolismes des lipides, des sucres et de l'azote et les conditions environnementales sont nombreuses et mal connues. L'étude de ces interactions permettra de comprendre comment ces organismes photosynthétiques intègrent les différents signaux environnementaux pour coordonner une réponse adaptative. Ces propriétés sont évidemment interspécifiques et dépendantes de l'histoire énergétique des cellules. En effet, il est certain que les modalités de la réponse des cellules dépendent de leur composition biochimique à l'instant de la perturbation, lequel est un intégrateur de leur histoire passée.

4.3.4 La carence en azote modifie la composition en acide gras des glycérolipides

Diverses études ont montré que la composition en acide gras de tous les glycérolipides est affectée par une carence en nitrate, les plus grandes transformations ayant été identifiées pour les acides gras des chloroplastes. Par exemple, Mock et Kroon (2002a) suggèrent que leur taux d'insaturation semble fortement corrélé à l'activité photosynthétique. Le ralentissement de la photosynthèse occasionné par une carence en nitrate s'accompagne donc d'une diminution de l'insaturation des membranes des chloroplastes.

Les acides gras polyinsaturés (PUFA), qui ne sont plus synthétisés pendant la carence, sont diversement affectés selon les espèces (Reitan *et al.* 1994). Les acides gras saturés et mono-insaturés augmentent considérablement. Ils semblent que ces transformations ne se produisent pas de façon systématique dans tous les glycolipides (Mock and Kroon 2002a, Mock and Kroon 2002b). Le maintien d'un certain taux d'insaturation semble nécessaire pour une

reprise ultérieure de la croissance. Le rôle des lipides dans la régulation de la photosynthèse, bien qu'important, est encore mal documenté.

Il a été démontré qu'une carence en nitrate diminue le degré d'insaturation des TAG, mais que ces variations sont très modérées (Mock and Kroon 2002a, Rodolfi *et al.* 2009). Il semble que les nouveaux acides gras insérés dans les TAG quand la croissance diminue soient essentiellement des acides gras saturés mais certaines espèces particulières semblent incorporer de forte proportions d'acide gras polyinsaturés (Khozin-Goldberg *et al.* 2000, Khozin-Goldberg *et al.* 2002, Tonon *et al.* 2002). Ces PUFA sont transférés vers les lipides polaires de structure lorsque la limitation est levée.

Nous avons vu que les métabolismes des trois principales classes de lipide étaient très imbriqués et que des échanges importants avaient lieu entre ces classes. Les échanges de DAG entre glycolipides, phospholipides et TAG dépendent des conditions environnementales.

4.4 Influence de la lumière

La réponse lipidique (classe de lipide, insaturation des acides gras) à des changements d'intensité lumineuse reste encore assez mal comprise. Une grande part de cette réponse adaptative, qui a lieu dans la membrane des chloroplastes et qui se traduit par un réarrangement de la structure des thylakoïdes, a comme effet d'accroître (ou maintenir ?) l'efficacité photosynthétique (et donc la croissance) dans un contexte énergétique déterminé (équilibre énergétique et redox de la cellule). On observe toutefois des modifications de la quantité des lipides neutres (triglycérides) dans certaines gammes d'intensité lumineuse. Les lipides membranaires extraplastidiens subissent des modifications plus faibles.

Les nombreuses études qui se sont intéressées à ces phénomènes présentent des résultats parfois contradictoires (Thompson *et al.* 1990) qui s'expliquent probablement par des

différences interspécifiques importantes, mais aussi par une réponse non monotone de la transformation des lipides à la lumière. En effet, la plupart des études s'intéressent aux lipides totaux ignorant les évolutions antagonistes qui s'opèrent au sein des triglycérides et des lipides membranaires.

4.4.1 Modification des classes de lipides

Il a été montré qu'une intensité lumineuse suboptimale pour la croissance entraînait une augmentation de la quantité de glycolipides (Klyachko-Gurvich 1999, Khotimchenko and Yakovleva 2005) et du ratio MGDG/DGDG (Mock and Kroon 2002b). Les galactolipides sont directement impliqués dans la photosynthèse. Chez les plantes terrestres comme *Arabidopsis*, il a été montré que l'absence de galactolipides chez un mutant peut affecter l'activité photosynthétique, particulièrement aux fortes intensités lumineuses (Holzl *et al.* 2006).

Une augmentation significative des triglycérides a par ailleurs été observée à forte intensité lumineuse (photoinhibant) (Orcutt and Patterson 1974, Gordillo *et al.* 2001, Khotimchenko and Yakovleva 2005), laquelle augmentation peut être attribuée à une redirection du carbone fixé vers les TAG de réserve (déséquilibre métabolique : sur-réduction de la chaîne de transport d'électrons, formation de ROS, etc.).

4.4.2 Modification de l'insaturation de ces lipides

Une augmentation de l'insaturation des acides gras en réponse à une augmentation d'intensité lumineuse a été observée dans plusieurs études (Opate 1974, Mortensen and al. 1988), de même que le phénomène inverse (Orcutt and Patterson 1974). Pourtant quelques généralisations sont possibles.

Tout d'abord, les cellules ajustent leurs niveaux de 16:0 et de 16:1 en fonction de l'intensité lumineuse. Le 16:0 varie presque toujours dans le même sens que l'intensité lumineuse

(Thompson *et al.* 1990, Mock and Kroon 2002b), alors que le 16:1 varie de manière beaucoup plus aléatoire suivant les espèces. On observe aussi des variations des proportions en acides gras polyinsaturés. Ces remaniements varient d'une espèce à l'autre, et suivant les lipides sur lesquels ils sont estérifiés. Mock and Kroon (2002b) montrent que chez deux diatomées arctiques, l'insaturation des triglycérides, du MGDG, du DGDG et du PG augmente lorsqu'on décroît l'intensité lumineuse à un niveau suboptimal de croissance.

Klyachko (1999) a également montré que, chez *Chlorella*, la lumière pouvait contrôler l'étape finale de la biosynthèse des acides triénoïques par désaturation des acides diénoïques correspondants. Certaines désaturases peuvent en effet être activées par la lumière (Kis *et al.* 1998) (augmentation de la quantité et de la stabilité de l'ARNm codant pour les désaturases).

4.5 Influence de la température

Les faibles températures, en affectant l'activité enzymatique, ralentissent le métabolisme et la croissance. A l'instar des effets induits par une forte intensité lumineuse ou une limitation par des nutriments, on observe une sur-réduction de la chaîne de transport d'électrons. Cela se traduit par un ajustement de l'appareil photosynthétique qui diminue sa capacité à capter l'énergie lumineuse. Il semble qu'en plus de cette régulation de l'absorption pigmentaire, les faibles températures restreignent le transport actif de nitrate. Des expériences effectuées sur des bactéries montrent en effet que le ralentissement de la croissance lors d'une diminution de température pourrait être attribué à l'inhibition de ce transport (Sakamoto and Bryant 1999).

Le métabolisme des lipides et notamment le processus de leur désaturation est aussi affecté par des changements de température. Il a été montré que le niveau d'insaturation des acides gras des lipides augmentait avec une diminution de température. Ce phénomène est souvent présenté comme un mécanisme permettant le maintien de la fluidité membranaire à basse température (homéoviscosité) (Sakamoto and Murata 2002). Pourtant, de nombreuses études contredisent cette adaptation (Thompson *et al.* 1992a, Thompson *et al.* 1992b), et montrent

des dynamiques inverses. Comme la plupart des études s'intéressent aux lipides totaux, il est une fois de plus difficile de séparer les effets de plusieurs processus physiologiques. En effet, on a vu que le taux d'insaturation des lipides des chloroplastes était souvent corrélé à l'activité photosynthétique de la cellule. Or, la diminution de température provoque une diminution de l'activité photosynthétique, et donc une diminution de l'insaturation des lipides. La plupart des observations effectuées sont difficiles à interpréter car elles résultent de la combinaison de ces deux phénomènes antagonistes. Comme le suggère Thompson *et al.* (1992b), il serait utile d'étudier la composition lipidique de certaines classes de lipides spécifiques (glycolipides), ou de travailler sur des membranes isolées (membranes des chloroplastes *versus* membranes des thylakoïdes) afin de différencier les effets de la réponse directe à la température des effets secondaires liés à la composante lipidique de la photoinhibition.

5. Conclusion

Les glycérolipides englobent donc des composés très divers dont la répartition et l'accumulation évoluent en fonction des conditions environnementales, notamment *via* la régulation de nombreuses enzymes (depuis les enzymes photosynthétiques jusqu'aux désaturases des glycolipides). Nous avons synthétisé quelques aspects de ces régulations, qui permettent de mieux comprendre la réponse lipidique du phytoplancton à des changements de l'environnement. Nous avons aussi montré que les lipides ne constituent pas un groupe fonctionnel homogène et doivent être séparés en différentes classes qui ont des fonctions différentes dans la cellule et donc des réponses également souvent antagonistes aux modifications des conditions de croissance.

La carence en azote entraîne souvent une accumulation de carbone sous forme de lipides de réserves. De plus, elle provoque une importante diminution de l'activité photosynthétique et de la synthèse de lipide. La compatibilité de ces conséquences peut être comprise si on prend

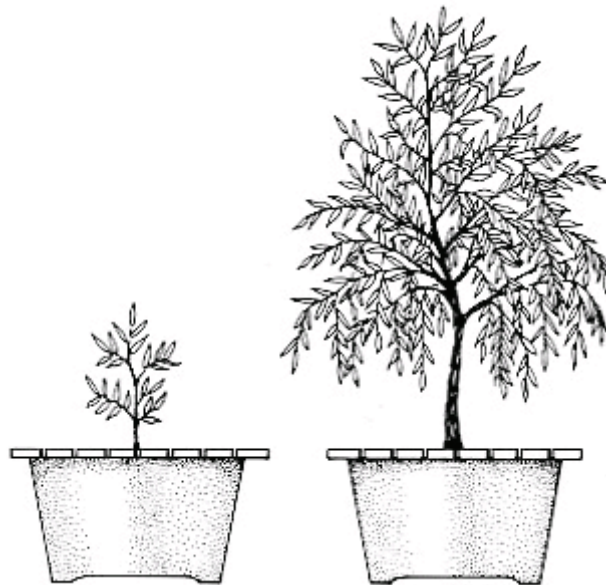
en compte les dynamiques temporelles des différents processus. La connaissance de ces dynamiques peut être aussi utilisé pour déterminer la production (ou productivité) de lipide par une population de cellule (Problématique Shamash).

Les études conduites sur l'influence du cycle lumineux diurne suggèrent une variation importante de la production de triglycérides au cours de la journée mais la connaissance des dynamiques d'accumulation et de consommation de ces lipides restent assez peu connue tout comme les effets des cycles lumineux sur l'accumulation de réserves en carence.

Dans tous les cas, la réponse à une contrainte dépend de l'espèce, de la souche et du clone étudié. Pour pouvoir comparer des expériences ou pour optimiser la production de certains lipides, il est donc impératif de choisir une espèce et une souche cible, et d'expérimenter au sein d'un système où les conditions de croissances (lumière, nutriment, température) sont parfaitement contrôlables.

Chapitre 2

II. Matériels et méthodes



Expérience de Von Helmont (1648). Un saule pousse dans un pot contenant une quantité de sol sec de 90,72 kg. On constate que cette quantité de sol sec n'a diminué en 5 ans que de 56.7g (voir Annexe 2 pour un petit historique sur la physiologie végétale).

Sommaire

1. CULTURES FERMEES VERSUS CULTURES EN CONTINU	71
1.1 Batch.....	71
1.2 Les cultures continues.....	73
1.2.1 Le chémostat	73
1.2.2 Le turbidostat, condition limite du chemostat	75
1.2.3 Le cyclostat	75
2. L'AUTOMATE DE CULTURE	77
3. CHOIX DE L'ESPECE DE MICRO-ALGUE	79
4. LES VARIABLES PHYSICO-CHIMIQUES	80
4.1 Composition du milieu.....	80
4.2 Le pH.....	80
4.3 Lumière.....	80
4.4 Température.....	81
4.5 Axénicité.....	82
4.6 Homogénéité de la culture	82
4.7 Mesure de l'azote inorganique dissous.....	82
5. LES DIFFERENTS DESCRIPTEURS DES MICROALGUES	83
5.1 Concentration cellulaire, Taille des cellules, Biovolume total.....	83
5.2 Azote et carbone particulaire.....	85
5.3 Chla, sucres totaux, protéines totales	85
6. QUANTIFICATION DES LIPIDES.....	86
6.1 Extraction, séparation et analyse des lipides (méthode biochimique)	86
6.1.1 Extraction des lipides totaux	86
6.1.2 Séparation des lipides totaux en 3 fractions : glycolipides, phospholipides et neutres.....	87
6.1.3 Quantification des classes de glycolipide	89
6.1.4 Composition en acides gras d'un extrait lipidique	89
6.2 Quantification des lipides par la méthode du Nile red.....	91
6.2.1 Propriétés de la molécule	91
6.2.2 Modification des spectres d'excitation et d'émission du Nile red en fonction de l'environnement lipidique.....	93
6.2.3 Temps d'incubation, saturation du matériel lipidique	95
6.2.4 Saturation du matériel par le Nile red.....	97

6.2.5 Influence de la concentration cellulaire.....	97
6.2.6 Relation entre la fluorescence du Nile red et la quantité de lipide neutre	99
6.2.7 Conclusion.....	99
7. TRAITEMENT DES DONNEES	100
7.1 Les différents types de normalisation.....	100
7.2 Carbone total vs. masse sèche	100
7.3 Taux de croissance et productivité	103

L'**écophysiologie** est une discipline de la biologie, à la frontière entre l'écologie et la physiologie, qui étudie les réponses comportementales et physiologiques des organismes à leur environnement. L'« environnement » se caractérise par différents facteurs qui ont été identifiés comme ayant une influence sur la physiologie de l'organisme étudié. Ces facteurs sont impossibles à lister de façon exhaustive. En **écophysiologie expérimentale**, on adopte une **stratégie réductionniste** en étudiant l'influence d'un ou plusieurs facteurs qu'on essaye de contrôler le mieux possible. Les autres facteurs doivent être maintenus constants pour s'affranchir de leur influence sur la physiologie de l'organisme étudié. Cette stratégie réductionniste qui consiste à fragmenter un système complexe en éléments plus simples à étudier est une méthode très efficace et largement utilisée en biologie mais elle présente certaines limites. Elle ignore les interactions entre les facteurs et ne permet donc pas d'en expliquer les propriétés émergentes. De plus, il est souvent impossible de maintenir constants tous les autres facteurs influents sur la physiologie des organismes étudiés.

Pour étudier l'écophysiologie des algues on utilise des systèmes de cultures dit fermés ou confinés (Culture Batch) ou de type ouvert (Culture en continu).

1. Cultures fermées versus cultures en continu

1.1 Batch

La culture en batch, dite fermée, n'est pourtant pas un **système fermé au sens strict** (qui n'opère pas d'échanges de chaleur, travail ou matière). La culture en batch reçoit de la lumière et opère des échanges de gaz et de chaleur avec l'extérieur. La culture en batch est largement utilisée en écophysiologie des algues de part sa facilité de mise en œuvre. Une des caractéristiques des cultures « batch » est l'impossibilité de maintenir constantes les conditions de culture qui évoluent avec le temps (ex : Concentration en nutriment). Pour contourner cette difficulté, les expérimentateurs maintiennent les paramètres

environnementaux dans une gamme de valeur dite « non limitante » tout au long de l'expérience sauf pour le paramètre à étudier. Par exemple, pour étudier l'influence de l'azote sur la croissance des algues on travaille avec des concentrations en nutriment largement en excès (saturante pour les algues) sauf pour l'azote qui deviendra limitant.

La culture de cellules en batch passe par différentes phases de croissance décrites pour les bactéries par Buchanan (1918) (Figure 1). Après une phase de latence, on observe une phase de croissance exponentielle qu'on peut qualifier de **croissance équilibrée**. Au cours de cette phase, les contraintes environnementales sont considérées comme non limitantes et les propriétés biochimiques, physiologiques et morphologiques des cellules comme constantes. Lorsqu'un des facteurs environnementaux devient limitant la croissance ralentit (phase de ralentissement) puis s'arrête (phase stationnaire).

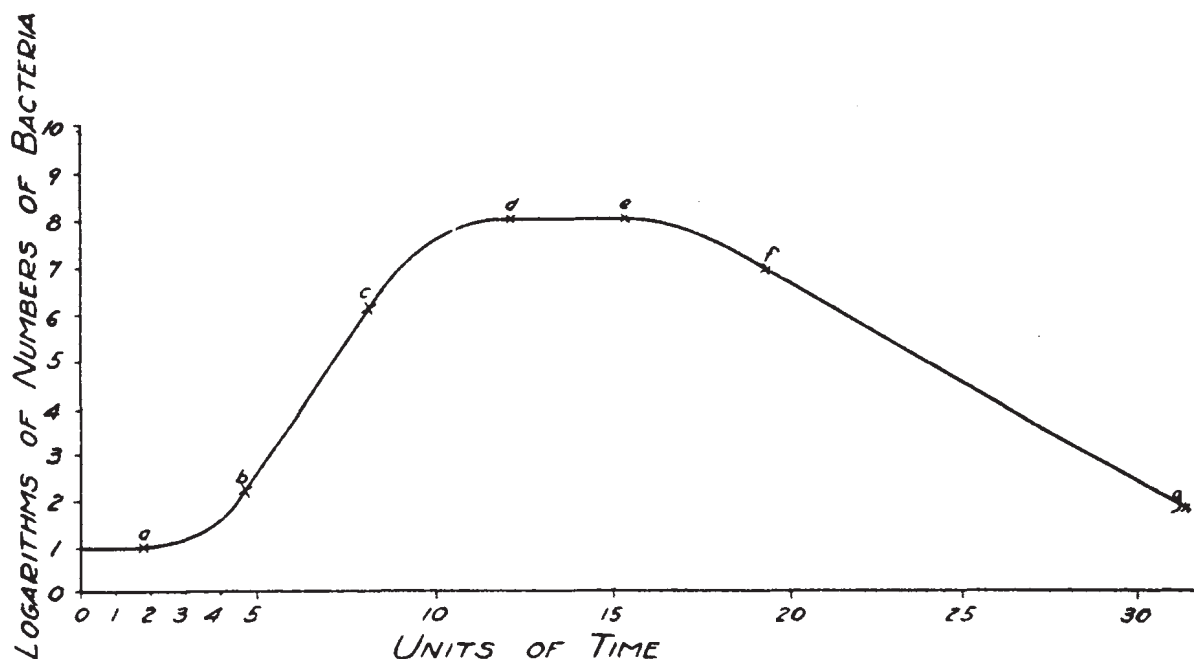


Figure 1 : Les 7 phases de la croissance définies par Buchanan (1918) : 1 Phase initiale stationnaire (avant a). 2 Phase d'accélération de la croissance (ab). 3 Phase de croissance exponentielle (bc). 4 Phase de décélération de la croissance (cd). 5 Phase stationnaire (de). 6 Phase d'accélération de la décroissance (ef). 7 Phase de décroissance exponentielle (fg).

L'inconvénient de ce type de culture est qu'il est impossible de maintenir dans le temps un même niveau de limitation. En effet, au cours de cette période transitoire, le niveau de limitation évolue constamment (ex : le nutriment s'épuise, la lumière diminue, le pH augmente...) entraînant une croissance déséquilibrée. Au cours de cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés à ces « états transitoires » de croissance déséquilibrée.

1.2 Les cultures continues

Pour faire face aux limitations des cultures en batch évoquées plus haut, ont été développées des cultures ouvertes ou continues. Il existe plusieurs catégories de cultures continues. Dans cette étude nous avons utilisé des cultures en chémostat, en turbidostat et en cyclostat (Figure 2).

1.2.1 Le chémostat

Dans un chémostat, on applique un taux de dilution qui est inférieur au taux de croissance maximum de la culture ce qui impose une limitation par l'un des paramètres environnementaux qui est appelé **le facteur limitant**. Un substrat est dit **limitant** s'il existe une relation de cause à effet entre l'épuisement de ce substrat et l'arrêt de la croissance. Dans une culture en chémostat, le milieu nutritif est constamment renouvelé par la dilution qui maintient constantes les conditions de croissance. On peut donc obtenir une culture limitée mais en **croissance équilibrée**. Le chémostat permet donc de s'affranchir de **l'histoire de la culture** (conditions environnementales précédentes) en maintenant constants tous les paramètres de la culture pendant de nombreuses générations de cellules.

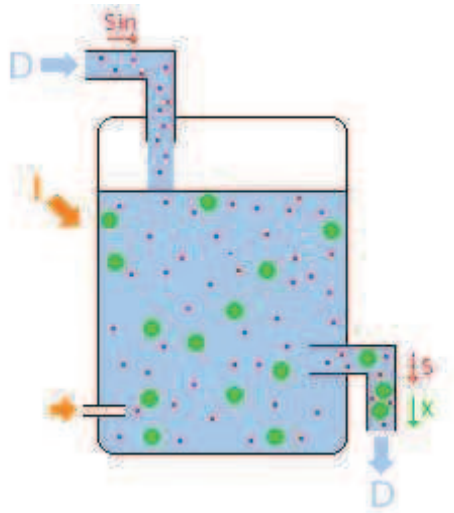


Figure 2 : Représentation schématique du bioréacteur. À $D=0$, $D < \mu_{\max}$ et $D \geq \mu_{\max}$ ce dispositif correspond respectivement à un batch, un chemostat et un turbidostat. D , Taux de dilution ; I , Intensité lumineuse ; s , concentration en facteur limitant ; S_{in} , concentration en facteur limitant dans le milieu de renouvellement ; x , biomasse ; μ_{\max} , Taux de croissance maximum en croissance non limitée. D'après Masci (communication personnelle).

Le chémostat est un formidable outil pour étudier la croissance des algues dans les concentrations en nutriment très faibles qui caractérisent les conditions naturelles de croissance. Il a été développé par Monod (1950) et Novick and Szilard (1950) pour étudier la croissance des bactéries. Jannasch (1967) montre qu'une culture en continu est un chémostat si et seulement si 1) l'organisme croît de façon exponentielle et est limité par un seul facteur, 2) les conditions de croissance sont constantes (volume de culture, taux de dilution, conditions physico-chimique), 3) un mélange homogène est maintenu.

1.2.2 Le turbidostat, condition limite du chemostat

Le turbidostat est un autre type de système de culture continue dans lequel la concentration de biomasse, mesurée par la turbidité de la culture, est maintenue constante par dilution de la culture avec du milieu neuf. Par extension, on appelle turbidostat une culture dont la biomasse (mesuré par le nombre de cellule, le carbone ou le biovolume total...) est contrôlée par le taux de dilution. Lorsqu'on impose à la culture un taux de dilution égal à son taux de division cellulaire maximal, on obtient un turbidostat. Ce mode de culture permet de maintenir un niveau de biomasse constant et une phase de croissance exponentielle non limitée par les ressources nutritives. Pratiquement, dans cette étude, les turbidostats ont été maintenus en réajustant quotidiennement le taux de dilution de manière à maintenir le nombre de cellules constant.

1.2.3 Le cyclostat

Le cyclostat est une culture en continue qui est soumise à des conditions nutritionnelles ou lumineuses cycliques. Les cycles d'éclairement nycthéral que nous avons imposés dans cette étude sont des exemples de cyclostat.

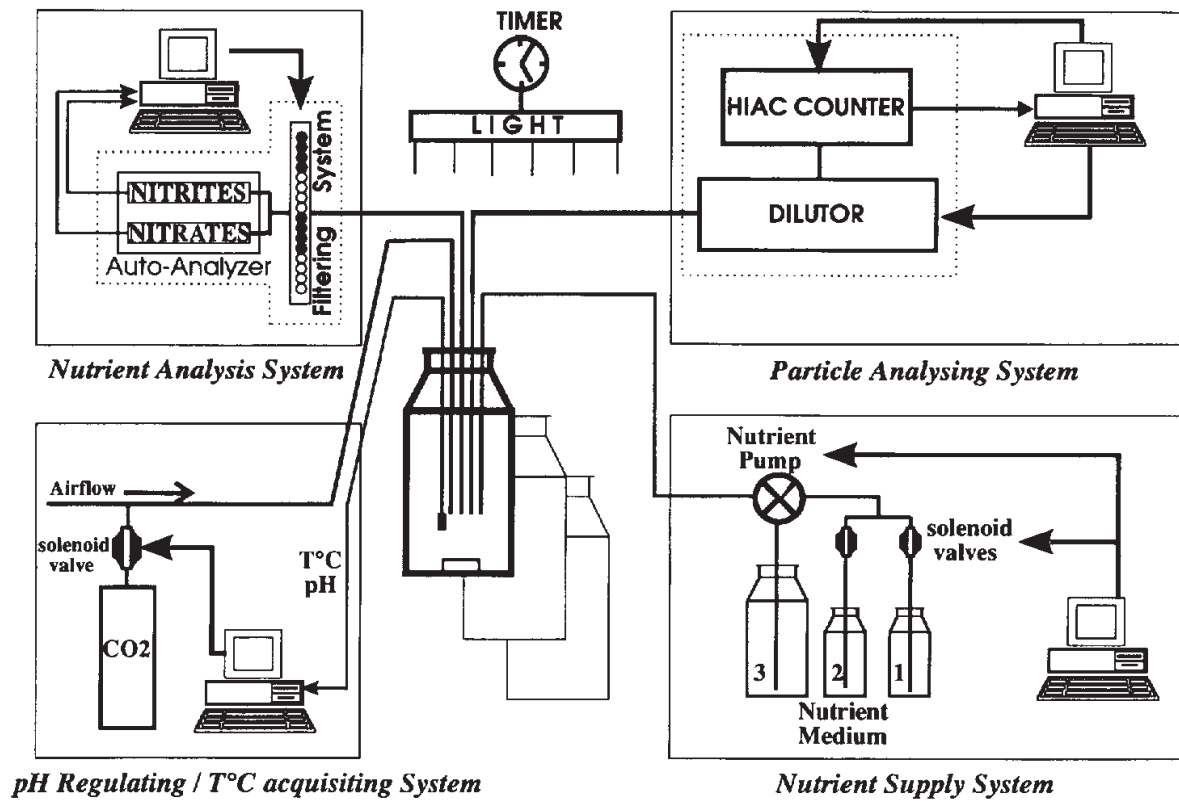


Figure 3 : Schéma synoptique de l'automate de culture. D'après Bernard *et al.* (1996).

2. L'automate de culture

Toutes les expériences de ce travail ont été réalisées sur le système de culture SEMPO (simulateur d'environnement marin piloté par ordinateurs) qui a été développé par Gilbert Malara et Antoine Sciandra (Malara and Sciandra 1991) puis modifié, complété, amélioré au cours des années suivantes par les différents utilisateurs du système (Figure 3). Ce système permet de contrôler automatiquement certains facteurs physiques et chimiques (pH, température, lumière, concentrations en nitrates et nitrites) et de mesurer en ligne certaines caractéristiques des cultures (Nombre, taille de cellule, biovolume total, NO_3 , NO_2 , pH...). S'ajoutent à ces mesures automatiques des mesures manuelles qui permettent de caractériser certaines propriétés des microalgues (CHN, $\text{Chl}a$, lipides, nombre de cellules par Coulter...). Grâce aux mesures automatisées des variables en continu, il est possible de s'intéresser à des processus dynamiques, et outre les études classiques de cultures en chémostat à l'état stable, d'étudier des phénomènes transitoires entre différents états d'équilibre en imposant des conditions dynamiques de croissance (ex : cycle jour/nuit). En imposant un taux de dilution nul on peut aussi obtenir une culture confinée en batch.

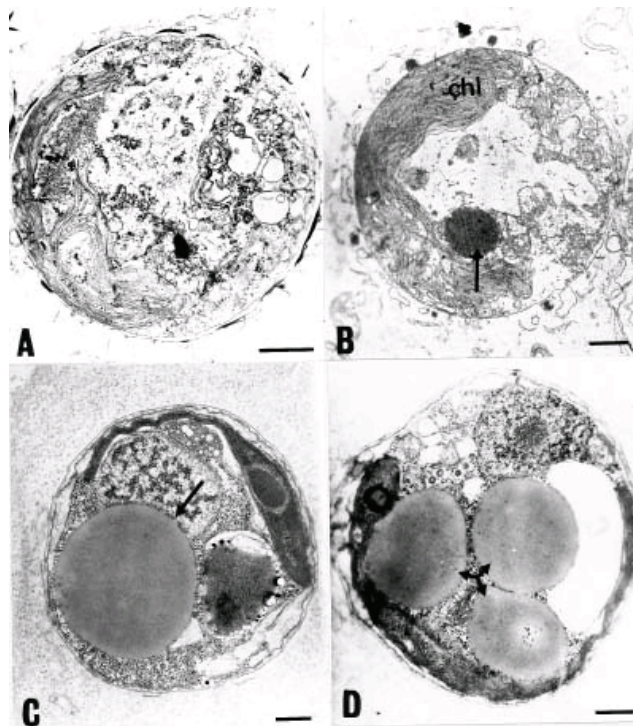


Figure 4 : Observation au microscope électronique à transmission d'*Isochrysis* sp. réalisée par Liu and Lin (2001). Les gouttelettes lipidiques (flèches) apparaissent à mesure que les cellules entrent en phase stationnaire de croissance (B-D). Echelle =500nm.



Figure 5 : Observation au microscope électronique à balayage d'*Isochrysis* sp. réalisée par Chrétiennot-Dinet (2004).

3. Choix de l'espèce de micro-algue

La souche d'*Isochrysis* utilisée dans cette étude provient d'Argenton (Arg98) mais elle a été caractérisée comme étant *Isochrysis* sp. CCAP 927/14. Cette souche est aussi appelée T-iso. C'est une Haptophycée, flagellé couramment utilisé en aquaculture (Figures 4 et 5). Cette algue a été choisie pour cette étude parce qu'elle présente des taux de croissance importants, n'est que peu sujette aux contaminations et enfin parce qu'elle contient des quantités significatives de lipides (Figure 4). De plus elle présente l'avantage d'avoir été largement étudié dans le passé (Caperon 1968, Sukenik and Livne 1991, Livne and Sukenik 1992, Flynn *et al.* 1993, Liu and Lin 2001, Valenzuela-Espinoza *et al.* 2002, Tzovenis *et al.* 2003, Eltgroth *et al.* 2005, Kang *et al.* 2009).

4. Les variables physico-chimiques

4.1 Composition du milieu

Les milieux de culture sont réalisés à partir d'eau de mer prélevée en surface à la sortie de la rade de Villefranche sur mer, au point B de coordonnées GPS (système WGS 84) : 43° 41,10' N - 7° 18.94 ' E. Filtrée sur cartouche millipore de porosité 0.7µm, elle est stockée dans des bombonnes en polyéthylène de 60 L. Pour la préparation des milieux, elle est à nouveau filtrée sur 0.22 µm, dans des bonbonnes de 20L en polycarbonate (Nalgène) avant d'être stérilisé à 110°C pendant 30 min. Après refroidissement, on enrichi stérilement l'eau de mer (à travers un filtre 0.22µm) en phosphates, métaux traces et vitamines suivant la composition du milieu f/2 (Guillard 1975). L'azote, le facteur limitant dans nos expériences, est ajouté en concentration beaucoup plus faible. Les bonbonnes de 20 L sont utilisées pour le remplissage initial des bioréacteurs et comme milieu de renouvellement pour les cultures en continu.

4.2 Le pH

Les algues, en consommant le carbone inorganique dissous provoquent une augmentation du pH si celui-ci n'est pas contrôlé. Dans la plupart des expériences réalisées, le pH a été maintenu à 8.0 ou 8.2 par injection contrôlée de CO₂ gazeux dans le milieu de culture suivant le protocole développé par Sciandra *et al.*(2003).

4.3 Lumière

Le flux de photons est délivré par deux rampes de six tubes fluorescents (Osram Dulux 55W) placées de part et d'autre des bioréacteurs. Un algorithme permet de programmer le signal lumineux désiré. Nous avons réalisé des expériences sous lumière continue et en cycle

Jour/Nuit (12 :12 h) (Figure 6). Pour ces dernières, la source de lumière simule la lumière naturelle du soleil (Bruyant *et al.* 2001).

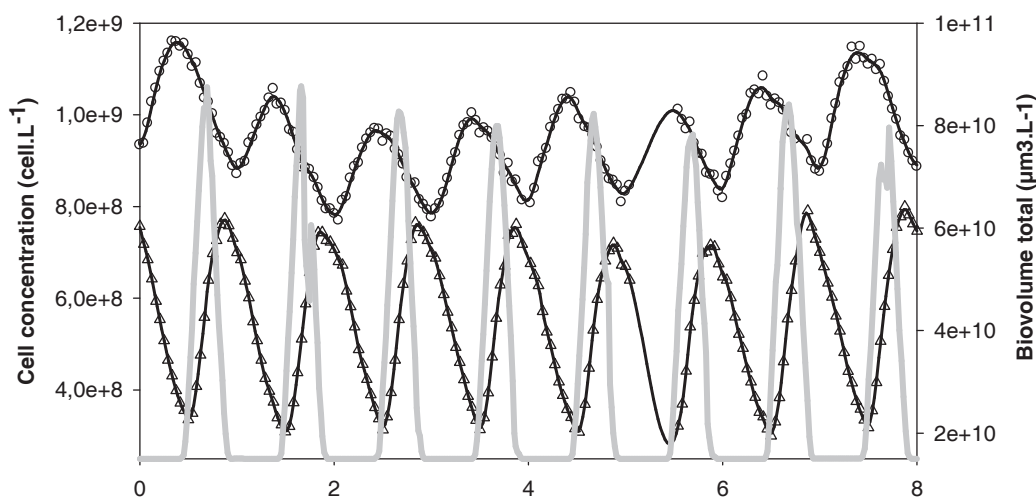


Figure 6 : Exemple de signal lumineux (en gris) qu'on peut imposer à une culture d'algue. La division cellulaire (Nombre de cellules : rond) et la croissance de la culture (Biovolume total : triangle) est entraînée par le signal lumineux. Pour plus d'information voir chapitre 6.

L'intensité lumineuse reçue par les micro-algues dépend de l'intensité de la source, de la disposition et de la géométrie des bioréacteurs par rapport à la source, et de l'auto-ombrage induit par le développement de la culture elle-même. L'intensité lumineuse est mesurée au centre des bioréacteurs par des quantamètres sphériques 2π (Biospherical Instruments QSL-100 et QSL-2100)

4.4 Température

La température de la culture est maintenue constante à 22°C grâce à une circulation d'eau thermostatée dans la double paroi externe des bioréacteurs.

4.5 Axénicité

Malgré une préparation axénique des expériences (autoclavage des milieux, rinçage à l'acide 10% de l'ensemble du dispositif de culture), les souches d'*Isochrysis* sp. utilisées ont permis de réaliser des cultures monospécifiques, mais non exemptes de bactéries. Leur nombre, estimé grâce au compteur de particules Multisizer 3, a pu atteindre celui des microalgues, notamment pour les cultures limitées en azote où l'excrétion de carbone organique dissous, substrat de croissance pour les bactéries, est favorisée. Mais même dans ces proportions, la contribution des bactéries à la biomasse totale des microorganismes reste très faible, et leur contribution aux flux de matière, négligeable.

4.6 Homogénéité de la culture

L'homogénéité est assurée par un barreau aimanté (agitateur magnétique) et par un bullage d'air qui permettent de réduire le dépôt de microalgues sur les parois et le fond des bioréacteurs. Avant d'être injecté, l'air est débarrassé de ses composés organiques (cartouche de charbons actifs Carbon Cap) et est filtré (cartouche de filtration Gamma Whatman, 0.3 μm).

4.7 Mesure de l'azote inorganique dissous

Les mesures de nitrates et nitrite ont été réalisées de manière automatique (Le Floch 2002) selon le protocole de Tréguer et Le Corre (1975). Un automate piloté par ordinateur (Bernard *et al.* 1996) assure la prise d'échantillons, leur filtration sur des filtres Gelman A/E, et leur introduction dans une chaîne d'analyse Technicon.

5. Les différents descripteurs des microalgues

La biomasse peut être estimée à l'aide de nombreux descripteurs qui donnent des informations différentes sur son état.

5.1 Concentration cellulaire, Taille des cellules, Biovolume total

Les cellules ont été comptées à l'aide de deux appareils différents. Le HIAC/ROYCO 9700 Pacific est composé d'un capteur optique et d'un laser. Chaque fois qu'une particule traverse le faisceau laser, elle est comptée, et son ombre projetée est mesurée. On obtient la concentration cellulaire et le diamètre équivalent sphérique des cellules. La détermination du diamètre moyen des cellules permet de calculer leur volume moyen, ainsi que le biovolume total. Les mesures sont réalisées automatiquement en triplicats toutes les deux heures après prélèvement et dilution automatique des échantillons dans les différentes cultures. Le Hiac présente certaines limites d'utilisation. Tout d'abord à forte densité cellulaire, la dilution réalisée automatiquement n'est pas suffisante et le Hiac sature. De plus, le Hiac n'est pas adapté pour mesurer précisément le nombre et la taille des cellules d'*Isochrysis* sp. lorsqu'elles sont synchronisées par le cycle lumineux (perte d'une partie du spectre). Le Multisizer 3 (Beckman) a été utilisé manuellement car ses mesures ne sont biaisées ni par les fortes concentrations en cellules (on réalise la dilution manuellement) ni par les cycles lumineux (il est capable de mesurer des particules beaucoup plus petites). Le Coulter enregistre une modification d'un champ électrique établi au travers d'un orifice par lequel le fluide contenant les particules est aspiré. Ce signal est proportionnel à leur volume et indépendant de leur forme. Les mesures au Coulter ont permis de valider les mesures automatiques du HIAC mais aussi d'en prendre le relais dans ses conditions limites d'utilisation. La figure 7 illustre certaines limites d'utilisation du Hiac.

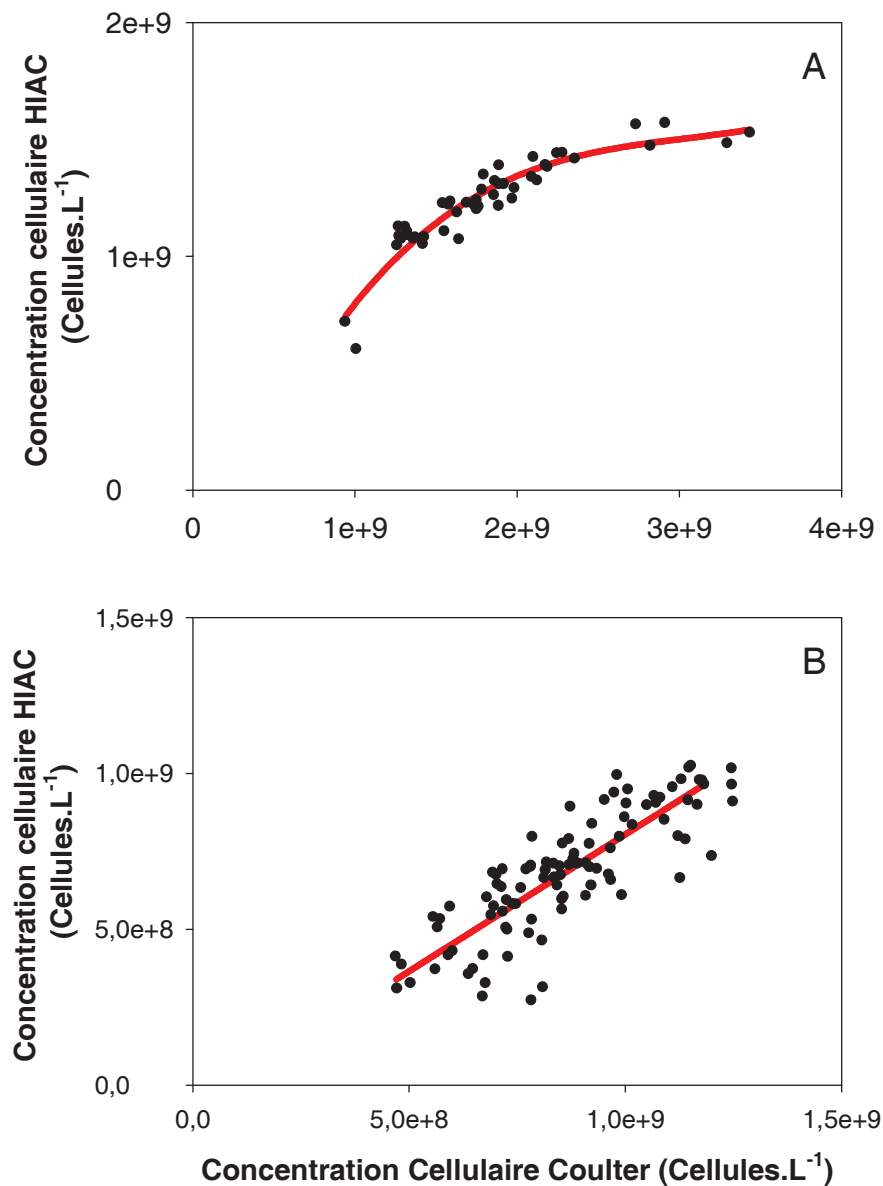


Figure 7 : A) Relation entre la densité cellulaire obtenue par le Coulter et par le HIAC dans les fortes densités cellulaires. A la dilution maximale du diluteur automatique, le HIAC sature à partir de 10^6 cellules par mL et seules les mesures réalisées au Coulter sont fiables. B) Relation entre le nombre de cellule mesuré au HIAC et au Coulter au cours des cycles J/N. Le Hiac ne compte pas les cellules les plus petites et sous estime donc la concentration cellulaire dans certaines périodes de la journée (après la division cellulaire).

5.2 Azote et carbone particulaire

Les concentrations en carbone et azote particulaires (mg.L^{-1}) ont été déterminées à partir de duplicats ou de triplicats de 10 mL de culture. Les aliquotes de cultures sont filtrés sur des filtres GF/C (Whatman) préalablement calcinés à 450°C pour en éliminer toutes traces de matière organique. Les échantillons filtrés sont conservés dans une étuve à 60°C . L'analyse est réalisée par chromatographie des gaz (CO_2 et N_2) dégagés lors de la combustion de l'échantillon (Perkin Elmer CHN Series 2 2400). Les erreurs relatives pour les mesures de carbone et d'azote sont respectivement inférieures à 3 et 5%.

5.3 Chl a , sucres totaux, protéines totales

Pour les 3 types d'analyse, des duplicats ou triplicats de 5 mL de culture ont été filtrés sur filtre GF/C (Whatman), lesquels sont immédiatement placés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C jusqu'à analyse. Pour analyser la Chl a , les filtres sont extraits dans un mélange diméthylsulfoxyde/acétone (3/2) (Shoaf and Lium 1976). On mesure ensuite la fluorescence du surnageant qui contient la Chl a extraite avec un fluorimètre (Turner design ; Ex : 436 ; Em : 680)(Welschmeyer 1994). Les sucres sont extraits et leurs concentrations (mg.L^{-1}) sont mesurées colorimétriquement selon la méthode de Dubois *et al.* (1956), après traitement des filtres avec un mélange acide Chlorhydrique/Phénol. La mesure des protéines totales est réalisée selon une méthode de Lowry modifiée (Lowry *et al.* 1951). Les protéines sont extraites par sonification, puis réagissent avec des réactifs commerciaux (kit Biorad DC Protein assay). Une mesure d'absorbance permet ensuite de déterminer la concentration en protéines (mg.L^{-1}) de l'extrait.

6. Quantification des lipides

6.1 *Extraction, séparation et analyse des lipides (méthode biochimique)*

Tous les lipides sont conservés à -80°C sous atmosphère inerte (Azote) pour éviter leur dégradation. Les différentes étapes de l'analyse de lipide sont résumées en Figure 8.

6.1.1 Extraction des lipides totaux

L'échantillon de culture d'*Isochrysis* sp. est concentré par centrifugations successives ou par filtration. Pour extraire les lipides totaux, on utilise la méthode de Bligh and Dyer (1959) modifiée. Les cellules phytoplanctoniques sont extraites dans un mélange monophasique 1-2-0,8 (Chloroforme-méthanol-eau) en réalisant un broyage de quelques minutes. Après filtration sur Buchner (filtre Whatman 541 – Ø 9 cm), le filtrat est transféré dans une ampoule à décanter. Le filtre est à nouveau extrait dans le même mélange extractant (chloroforme-méthanol-eau). Après une nouvelle filtration sur Buchner (filtre Whatman 541 – Ø 9 cm), le filtrat est ajouté au filtrat précédent dans l'ampoule à décanter. On ajoute alors dans cette ampoule des volumes de chloroforme et d'eau (NaCl 0.7%) de manière à obtenir un mélange de chloroforme, de méthanol et d'eau dans des proportions 2-2-1.8. Le système devient alors diphasique (séparation des phases polaires et apolaires). L'ampoule est ensuite agitée énergétiquement, puis l'oxygène de l'air présent dans l'ampoule est évacué par un bullage d'azote à l'aide d'une pipette pasteur. Après un temps de décantation de 2 heures, la phase chloroforme qui contient les lipides et la plupart des pigments est récupérée et le solvant évaporé. Après transfert et lyophilisation dans un pilulier taré, les lipides totaux sont pesés (la pesée présente une incertitude de 10 µg).

6.1.2 Séparation des lipides totaux en 3 fractions : glycolipides, phospholipides et neutres.

Les différentes classes de lipide sont séparées par chromatographie sur colonne Alltech (Extract clean) de 4 mL contenant 500mg de silice en utilisant un système de solvant de polarité croissante adapté de Vorbeck and Marinetti (1965) (Voir Tableau 1).

Tableau 1 : Protocole d'élution séquentielle des classes lipidiques principales

<i>Classe de lipide</i>	<i>Solvant</i>	<i>Volume de solvant</i>
Lipides neutres	Chloroforme	12mL
Glycolipides	Acétone	8mL
Phospholipides	Méthanol Méthanol/Amoniaque(90:10)	10mL 4mL

Après un lavage de la colonne au chloroforme (10mL), les lipides totaux sont déposés dans le plus petit volume possible (200µL). Les différents solvants sont ensuite ajoutés et les fractions contenant les différentes classes de lipide collectées au fur et à mesure. Les fractions sont ensuite évaporées et les lipides pesés. Cette opération sépare les lipides totaux en 3 groupes de lipides de polarités différentes. Les fractions entraînées par le chloroforme, l'acétone et le méthanol sont très enrichies en « lipide neutre », glycolipides et phospholipides respectivement. Les dénominations de lipides neutres, glycolipides et phospholipides dans cette thèse correspondent en fait à des fractions enrichies en chacune de ces 3 classes de lipide.

La pureté des fractions peut être vérifiée par chromatographie sur couche mince (exemple : 250 µm, 20 X 20 cm; Adsorbosil-Plus 1, Alltech, France) en utilisant un système CHCl₃/CH₃OH/H₂O (70/30/4) pour les glycolipides, n-hexane/diéthyl éther/acide acétique (170:30:2) pour les lipides neutres. Les plaques peuvent ensuite être révélées à la dichlorofluorescéine.

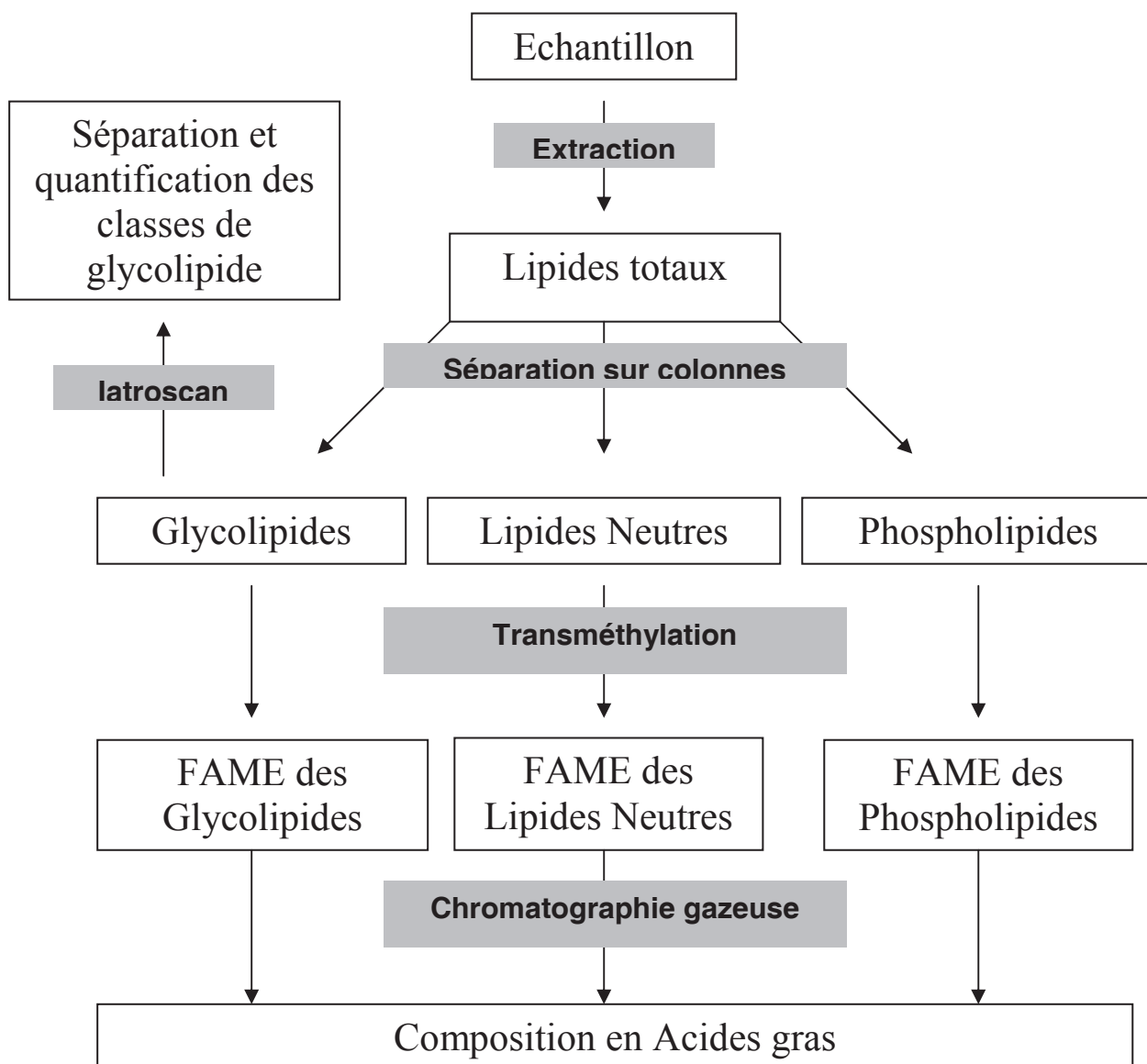


Figure 8 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'analyse des lipides, depuis l'extraction jusque l'analyse des acides gras en chromatographie gazeuse. (Abréviation : FAME = Fatty Acid Methyl Ester ou acide gras méthylé)

Pour approfondir les analyses, les triglycérides peuvent être séparés du reste des neutres par chromatographie sur couche mince (CCM) avec un système de solvant approprié: n-hexane/diéthyl éther/acide acétique (170:30:2) (révélation: dichlorofluorescéine).

6.1.3 Quantification des classes de glycolipide

Une fraction aliquote de chaque extrait de glycolipides est analysée pour quantifier les différentes classes de glycolipides (MGDG, DGDG, SQDG) à l'aide d'un Iatroscan MK V TH 10. Le principe de la méthode est basé sur la séparation physique des différentes classes par chromatographie sur couche mince sur gel de silice (Chromatorod – SIII), puis sur leur quantification par le biais d'un détecteur à ionisation de flamme. Les glycolipides sont appliqués sur les rodes grâce à un automate (SAS A4100 autospotter) qui dépose 1µL de chloroforme sur chaque rode. Les analyses sont réalisées en triplicats. La séparation des glycolipides est réalisée dans un mélange chloroforme/éthyle acétate/acétone/méthanol/acide acétique/eau (60/12/15/16/3/3). La calibration est réalisée en utilisant des standards commerciaux.

6.1.4 Composition en acides gras d'un extrait lipidique

La composition en acide gras est obtenue après transméthylation de l'extrait lipidique par la méthode de Morrison and Smith (1964) avec du BF₃-MeOH à 7%. L'analyse des acides gras méthylés des différentes fractions est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer Autosystem) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne polaire FameWax (Restek – longueur 30m), le gaz vecteur utilisé est l'hélium

(méthode isotherme à 185°C ; 140 minutes ; Injecteur à 225°C, détecteur à 250°C, débit d'air 400 mL.min⁻¹, débit d'hydrogène 40 mL.min⁻¹). Les acides gras méthylés sont injectés à une concentration de 20µg.µL⁻¹. L'utilisation de standards a permis l'identification des composés correspondant aux différents pics des chromatogrammes : des standards primaires (commerciaux) contenant les acides gras les plus courants, et un standard secondaire (mélange d'huiles marines: mélange Menhaden-Capelin) dont la composition en acides gras est connue. A partir des temps de rétention de ces standards, les longueurs équivalentes de chaîne ont été calculées à l'aide de régressions linéaires entre le logarithme du temps de rétention et le nombre de carbone dans le composé (Ackman and Ratnayake 1989). Des profils déjà identifiés au laboratoire ont aussi été utilisés. Afin de préciser et/ou de confirmer certaines identifications, une hydrogénation catalytique a été réalisée pour un échantillon de chaque classe de lipide.

Toutes les données obtenues sont traitées par une matrice de correction établie précédemment par le laboratoire pour corriger les erreurs liées aux différents coefficients de réponse des acides gras au détecteur à ionisation de flamme. Les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse sont sujets à des erreurs de respectivement 5, 10 et 30 % pour les composés majeurs (>10%), intermédiaires (1-9%) et mineurs (<1%) (Mayzaud and Ackman 1976).

L'indice d'insaturation qui reflète le degré d'insaturation des acides gras d'une classe de lipide est calculé ainsi :

$$\text{Indice d'insaturation} = \text{Polyunsaturés} / (\text{saturés} + \text{Monoènes})$$

6.2 Quantification des lipides par la méthode du Nile red

La technique d'analyse des lipides phytoplanctoniques est assez longue et fastidieuse car elle requiert une séparation de la biomasse algale de la phase aqueuse, une extraction de la phase lipidique, et une quantification des classes de lipides. Ces opérations sont temporellement différées de la phase de production des microalgues, de sorte qu'il n'est pas possible d'utiliser le dosage chimique pour avoir un indice en temps réel du pool lipidique d'une culture. Pourtant, une estimation rapide des lipides phytoplanctoniques s'avère nécessaire pour optimiser le contrôle de bioprocédés visant à assurer cette production, car comme nous le verrons, les lipides n'ont pas forcément les mêmes dynamiques temporelles que le reste de la biomasse.

Une autre approche couramment utilisée pour la mesure des lipides est la technique de marquage au Nile red. Ce fluorochrome peut être excité et émettre de la fluorescence lorsqu'il se trouve dans un environnement apolaire. Il peut donc être utilisé pour doser les lipides intracellulaires du phytoplancton. Cette méthode optique, étant en principe simple et rapide à mettre en oeuvre, a été utilisée parallèlement aux mesures biochimiques pour la plupart des expériences réalisées.

Bien que simple en apparence, le protocole a dû être optimisé afin de garantir la fiabilité des mesures. C'est pourquoi je présente quelques données relatives à cette méthode, qui sont issues de la littérature et de nos expériences au laboratoire.

6.2.1 Propriétés de la molécule

Le Nile red (Figure 9) est couramment utilisé comme marqueur pour étudier les structures lipidiques. C'est une molécule relativement photostable, très peu soluble, très peu fluorescente dans l'eau (Greenspan *et al.* 1985), mais qui fluoresce dans un environnement

hydrophobe. Bonne sonde hydrophobe, elle s'insère dans les différentes structures lipidiques de la cellule (gouttelettes lipidiques, membranes...). Certaines études ont montré une relation linéaire entre la quantité de lipides totaux et la fluorescence du Nile red (Cooksey *et al.* 1987, Lee *et al.* 2004), mais certains chercheurs ont aussi soulevé des difficultés inhérentes à cette méthode.

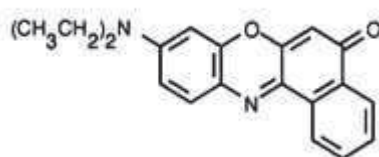


Figure 9 : Structure de la molécule de Nile red

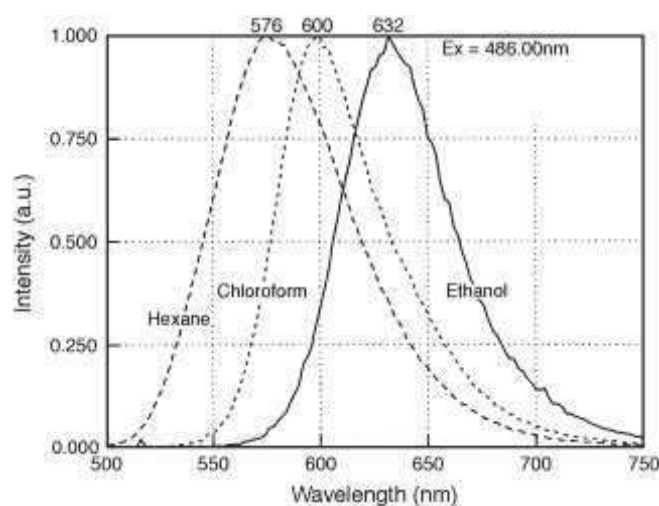


Figure 10 : Spectre d'émission du Nile red dans différents solvants. Polarité des solvants : Hexane < Chloroforme < Ethanol (d'après Elsey *et al.* (2007))

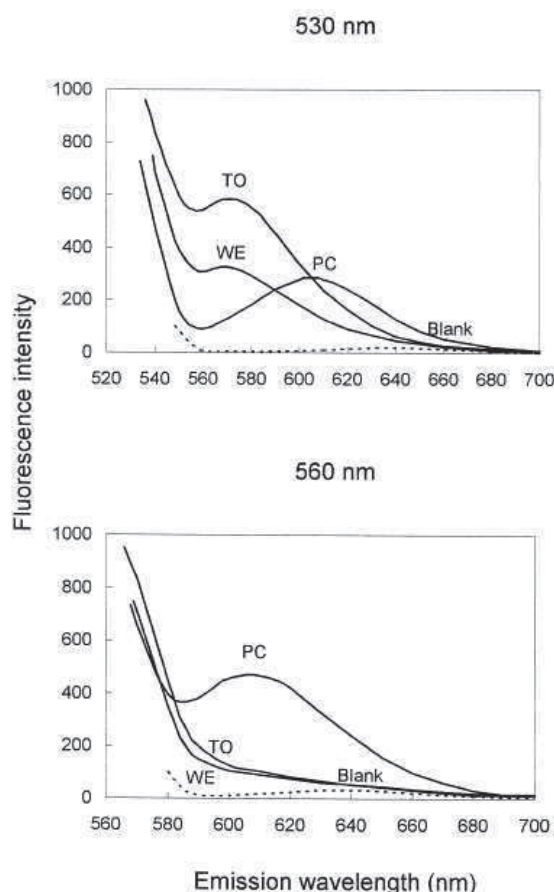


Figure 11 : Spectre d'émission de microémulsions de solution commerciale de Triglycérides (TO), Phosphatidylcholine (PC), et cire (WE) marquées au NR. Les scans sont réalisés à des longueurs d'onde d'excitation de 530 et 560 nm (D'après Alonzo and Mayzaud (1998)).

6.2.2 Modification des spectres d'excitation et d'émission du Nile red en fonction de l'environnement lipidique.

Tout d'abord, il a été démontré que le maximum d'émission du Nile red pour une longueur d'onde d'excitation donnée se décale vers le rouge lorsque la polarité de son environnement lipidique augmente (Figure 10) (Cooksey *et al.* 1987, Elsey *et al.* 2007). Ceci a aussi été démontré par Alonzo et Mayzaud (1998) qui ont travaillé sur des liposomes contenant une seule espèce de lipide (Figure 11). Dans un environnement plus polaire (Phospholipides, glycolipides) le Nile red émet dans des longueurs d'onde plus grandes que lorsqu'il se trouve

dans un environnement neutre (Triacylglycérol - TAG). Tout se passe comme si chaque molécule de Nile red dans un environnement lipidique donné se comportait comme un fluorophore à part entière. Lorsqu'on excite à une longueur d'onde spécifique on « allume » les molécules de Nile red insérées dans un type d'environnement lipidique particulier. Cette propriété peut être utilisée pour observer les différentes structures lipidiques d'une cellule (Gouttelettes lipidiques, membranes, Photo 1) mais il est difficile de discriminer les différents types de lipide par des mesures spectrofluorimétriques (spectre patatoïde).

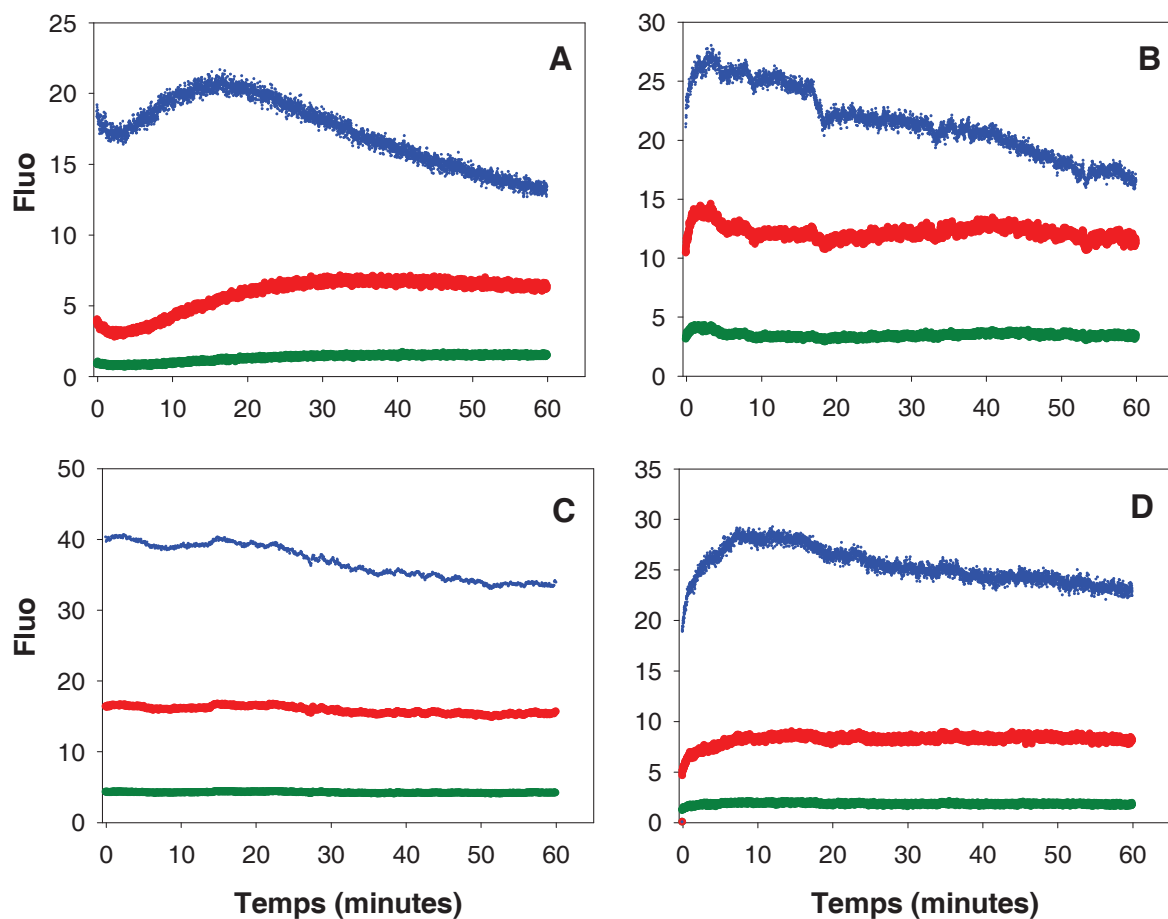


Figure 12 : Evolution de la fluorescence pour 3 couples de longueur d'onde Excitation/Emission (480/560 : vert, 520/580 : rouge, 540/620 : bleu) de cultures de *Thalassiosira pseudonana* (A), *Thalassiosira oceanica* (B), *Isochrysis sp.* (C) et *Heterosigma akashiwo* (D) marquées au Nile red. Les mesures commencent 30s après l'injection du Nile red (t0).

6.2.3 Temps d'incubation, saturation du matériel lipidique

Nous avons réalisé, pour 4 espèces d'algues et pour différentes combinaisons de longueurs d'onde d'excitation et d'émission, des cinétiques de marquage au Nile red dans le but de déterminer les temps d'incubation permettant l'obtention d'une intensité de fluorescence maximale ou/et stable dans le temps (Figure 12).

Les couples 480/560 et 520/580 sont les couples couramment utilisés pour la quantification des lipides neutres (TAG). Le couple 520/560 correspond au maximum de fluorescence du Nile red en présence de TAG purs (Alonzo and Mayzaud 1998). Le couple 560/620 correspond au maximum d'intensité pour notre culture de *Isochrysis* sp. et aussi au maximum d'intensité du Nile red dans un environnement phospholipidique. Pour *Isochrysis* sp., le maximum d'intensité de fluorescence est atteint en moins de 30s et celle-ci reste relativement stable pendant une heure (la durée de l'expérience). L'intensité de fluorescence évolue différemment pour les 3 couples de longueur d'onde. En effet le signal du couple 480/560 est beaucoup plus stable (taux de décroissance : $0.068\%.\text{min}^{-1}$) que le signal des couples 520/580 (taux de décroissance : $0.15\%.\text{min}^{-1}$) et 540/620 (taux de décroissance : $0.32\%.\text{min}^{-1}$). Ces observations révèlent les comportements du Nile red dans les différents environnements lipidiques. L'intensité de fluorescence est donc plus stable lorsque le Nile red se situe dans un environnement apolaire (exemple : gouttelette de triglycéride) que lorsqu'il se situe au milieu de lipides plus polaires (membranes). Cette interprétation reste à confirmer par des résultats futurs.

Les cinétiques sont différentes pour chaque espèce d'algue. Le temps d'incubation correspondant au maximum d'intensité de fluorescence est donc différent selon les espèces, Cooksey *et al.* (1987) et pour une même espèce selon la composition lipidique comme l'avaient montré Lee *et al.* (1998).

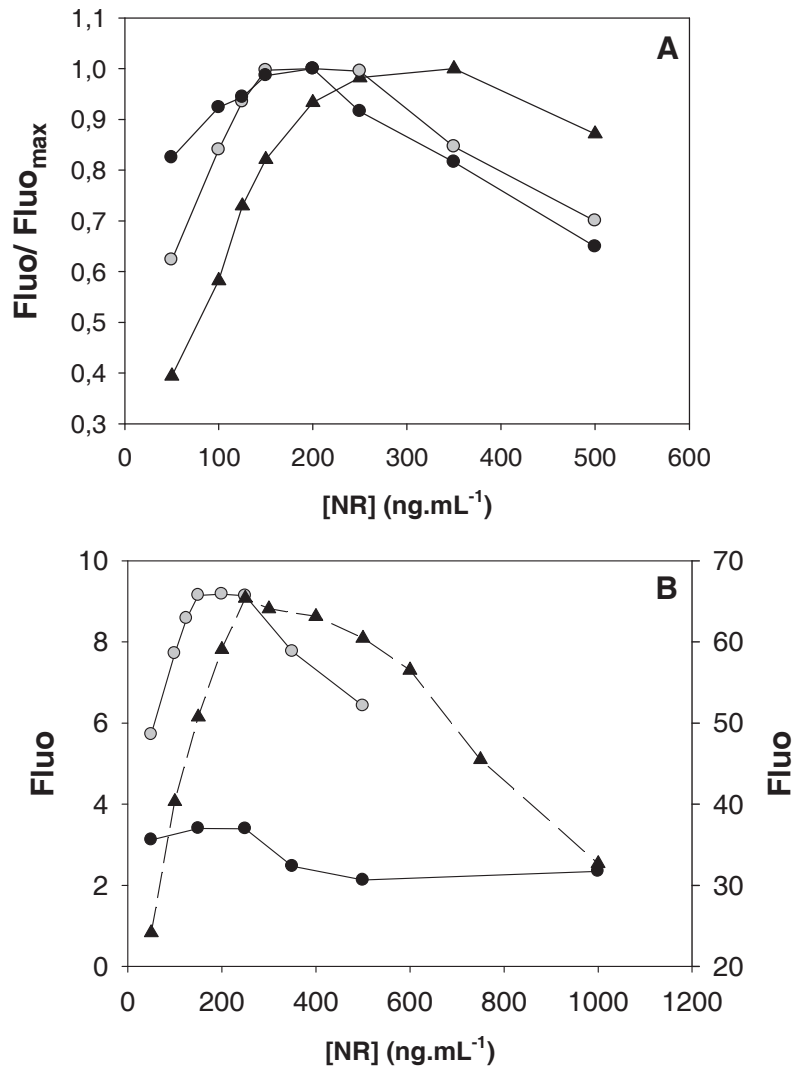


Figure 13 : A) Relation entre l'intensité de fluorescence (normalisé par la fluorescence maximale) et la concentration en Nile red (ng.mL⁻¹) pour 3 couples de longueur d'onde (480/560 : Points noirs, 520/580 : Points gris, 540/620 : Triangles noirs). B) Relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration en Nile red (ng.mL⁻¹) pour un couple de longueur d'onde (520/580, Ex/Em) pour trois cultures différentes (Points noirs : phase exponentielle de croissance ; Points gris : début de carence ; Triangles noirs : état de carence avancée, Axe droit).

6.2.4 Saturation du matériel par le Nile red

La concentration en fluorophore ajouté est un paramètre important pour la mesure des lipides phytoplanctoniques. Afin de déterminer la concentration optimale, nous avons tout d'abord déterminé la relation qui existe entre la concentration en Nile red et l'intensité de fluorescence pour une même culture d'*Isochrysis* sp. (Figure 13A). La fluorescence maximale est atteinte pour des concentrations en fluorophore différentes selon le couple de longueur d'onde de mesure. Comme le Nile red s'insère en priorité dans des milieux apolaires (gouttelette lipidique), le marquage des autres structures lipidiques n'apparaît que pour des concentrations plus importantes de fluorophore.

Nous avons aussi montré que l'on peut déterminer une concentration optimale de fluorophore qui reste optimale pour des cultures très différentes en termes de concentration cellulaire et de teneur en lipide (Figure 13B). Nous avons ainsi déterminé qu'une concentration en Nile red de 250 ng/mL permet de marquer de manière optimale toutes sortes de cultures pour le couple de longueur d'onde (520/580; Ex/Em) qui est spécifique des lipides neutres que nous désirons précisément étudier.

6.2.5 Influence de la concentration cellulaire

Nous avons également étudié l'influence de la concentration cellulaire sur la mesure de lipide (Figure 14). Pour le couple 520/580 la relation entre la quantité de cellule et la fluorescence est bien linéaire et passe par l'origine. Ces observations démontrent l'indépendance de la relation Nile red/Lipide vis-à-vis de la concentration cellulaire. Il est donc inutile, en tout cas pour *Isochrysis*, d'ajuster la concentration cellulaire pour réaliser les mesures de fluorescence du Nile red.

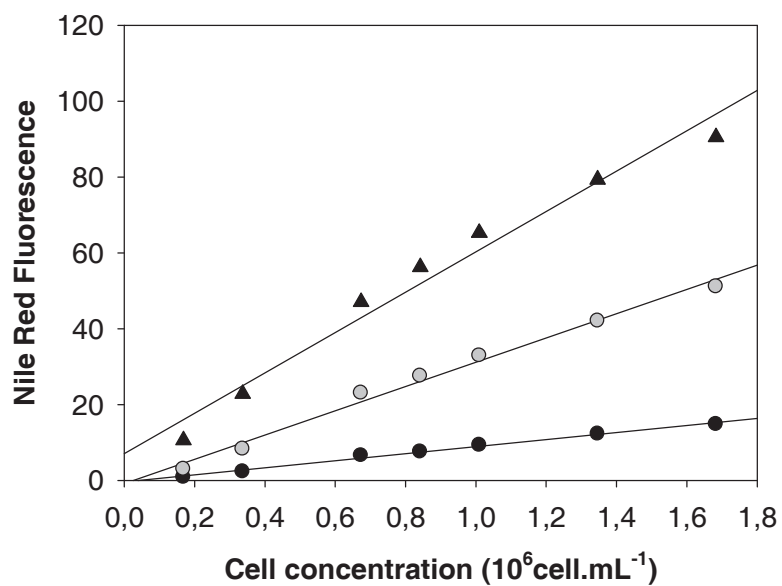


Figure 14 : Relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration cellulaire d'*Isochrysis* sp. obtenue par dilution de la culture (0.5mL ; 1mL ; 2mL ; 3mL ; 4mL ; 5mL dans 5mL) pour 3 couples de longueur d'onde (480/560 : Points noirs, 520/580 : Points gris, 540/620 : Triangles noirs). Dans tous les cas concentration en Nile red est identique, égale à 250ng par mL de culture.

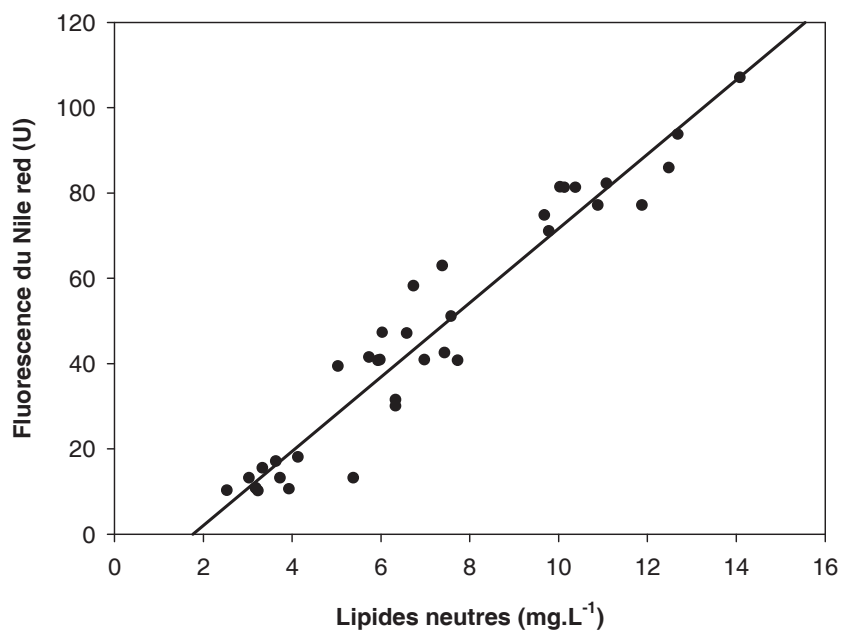


Figure 15 : Relation entre la fluorescence du Nile red (520/580, Ex/Em) et la concentration en lipides neutres (mg.L^{-1}) mesurée après extraction et séparation sur colonne.

6.2.6 Relation entre la fluorescence du Nile red et la quantité de lipide neutre

Nous avons aussi pu montrer une relation linéaire entre la concentration en lipide neutre et la fluorescence de Nile red (520/580, Ex/Em) avec une bonne corrélation (Figure 15; $n=36$, $R^2=0.93$).

6.2.7 Conclusion

Nous avons donc montré que la technique « Nile red » permet de quantifier correctement la concentration en lipides neutres d'une culture d'*Isochrysis* sp.. Nous avons déterminé les temps d'incubation et la concentration en fluorophore nécessaires et démontré que la densité cellulaire n'avait pas d'influence sur la mesure. Dans cette étude, cette méthode a été employée au cours de l'expérience en cycle jour/nuit qui exigeait une fréquence d'échantillonnage très importante. Dans les autres expériences, cette mesure au Nile red a été réalisée en parallèle des mesures biochimiques et a permis de suivre en temps réel la concentration en lipides neutres dans nos cultures.

7. Traitement des données

7.1 Les différents types de normalisation

Les mesures réalisées (voir sections 5 et 6) nous fournissent les concentrations (mg.L^{-1}) de différents composés qui nous permettent de caractériser l'état de la culture (Chla, sucre, protéine, lipide, carbone, azote etc.). Il existe plusieurs manières de normaliser ces concentrations : par la biomasse sèche totale, le carbone total, le nombre de cellules, le biovolume total, l'azote total... La normalisation présente l'avantage de s'affranchir du niveau de biomasse de la culture et permet donc de comparer des études qui ont été réalisées à des niveaux de biomasse différents. La normalisation est une question importante car chaque type de normalisation apporte des informations différentes sur l'état de la culture.

Dans cette étude nous avons principalement normalisé les descripteurs de la biomasse par le carbone total (appelé quota) et par le nombre de cellule. Ces deux normalisations sont très différentes car la quantité moyenne de carbone par cellule n'est pas constante, particulièrement lorsque la culture est synchronisée (Voir chapitre 5).

7.2 Carbone total vs. masse sèche

Nous n'avons pas réalisé de mesure de la masse sèche (M) et avons normalisé les différents descripteurs de la biomasse par le carbone total (C). Masse sèche et carbone total ne sont pas équivalents car le pourcentage de carbone dans la biomasse est modifié par les conditions de croissance : $C = M \times P_C$ (P_C est le pourcentage de C dans M).

Si on fait l'approximation que la biomasse est constituée uniquement de lipides (L), de sucres (S) et de protéines (P), et que les pourcentages de C dans ces différentes fractions sont fixes, égaux à 0.65, 0.4 et 0.4 respectivement, on obtient :

$$P_C = 0.65 \times \frac{L}{M} + 0.4 \times \frac{S}{M} + 0.4 \times \frac{P}{M}$$

Et donc :

$$\frac{L}{M} = \frac{L}{C} \times \left(\frac{L}{M} \times 0.65 + \left(1 - \frac{L}{M}\right) \times 0.4 \right) = \frac{L}{C} \times \left(\frac{L}{M} \times 0.25 + 0.4 \right)$$

On obtient donc :

$$\frac{L}{M} = \frac{L/C}{1 - 0.25 L/C} \times 0.4$$

On peut donc tracer cette relation entre le quota en lipide normalisé par la masse sèche et le quota en lipide normalisé par le carbone total (Figure 16).

Pour obtenir une telle relation pour les sucres on est obligé de fixer le pourcentage de carbone de la partie non liée aux sucres de la biomasse qui est composée de lipides et de protéines. Nous avons choisi pour cette partie un pourcentage de carbone de 52.5% (Moyenne entre le pourcentage de carbone dans les sucres et dans les lipides). La valeur de ce pourcentage n'influence que très peu la relation entre les quotas (données non montrées).

On obtient ainsi pour le quota en sucre :

$$\frac{S}{M} = \frac{S}{C} \times \left(\frac{S}{M} \times 0.4 + \left(1 - \frac{S}{M}\right) \times 0.525 \right) = \frac{S}{C} \times \left(-0.125 \frac{S}{M} + 0.525 \right)$$

$$\frac{S}{M} = \frac{S/C}{1 + 0.125 S/C} \times 0.525$$

De la même manière pour le quota en protéines on obtient :

$$\frac{P}{M} = \frac{P/C}{1 + 0.125 P/C} \times 0.525$$

On voit que cette relation est différente en fonction de la classe de molécule étudiée (Figure 16).

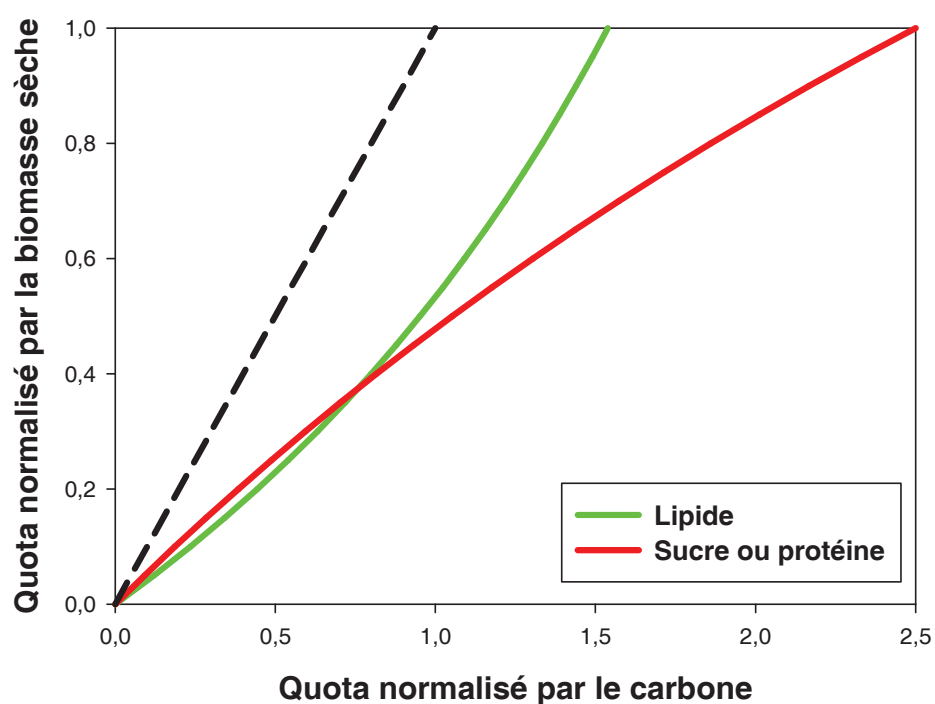


Figure 16 : Relation théorique entre les quotas normalisés par le carbone et les quotas normalisés par la masse sèche pour différents types de composés (lipide : vert, sucre ou protéine : rouge). Les différences s'expliquent par des contenances en carbone de la biomasse qui varient en fonction de la composition de cette biomasse. La ligne en pointillé représente la droite 1:1.

7.3 Taux de croissance et productivité

A partir des données brutes mesurées (mg.L^{-1} ou cellules.L^{-1}) on peut calculer des taux de croissance spécifique et des taux de production (ou productivité).

Le taux de croissance spécifique d'un composant i ayant une concentration C_i dans la culture est :

$$\mu_i = \frac{1}{C_i} \cdot \frac{dC_i}{dt} + D \quad (\text{j}^{-1}) \quad (1)$$

Ce taux peut être estimé à partir des mesures discrètes réalisées au temps t_1 et t_2 par :

$$\mu_i = \frac{\ln\left(\frac{C_i(t_2)}{C_i(t_1)}\right)}{t_2 - t_1} + D \quad (\text{j}^{-1}) \quad (2)$$

Dans cette étude, μ_C , μ_{NL} et μ_{car} sont les taux de croissance spécifique du carbone, des lipides neutres et des sucres respectivement. μ_{Cell} est le taux de division cellulaire. A l'état stable du chimostat (croissance équilibrée) ces taux sont, par définition, égaux au taux de dilution de la culture.

Les taux de production (ou productivité) normalisés par le carbone sont calculés de la manière suivante :

$$P_i = \mu_i \cdot \frac{C_i}{C_c} \quad (\text{mg.mg C}^{-1}.\text{j}^{-1}) \quad (3)$$

La productivité normalisée par le carbone ($\text{mg.mg C}^{-1}.\text{j}^{-1}$) nous semble plus intéressante que celle normalisée par le volume liquide du bioréacteur ($\text{mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$) car elle est indépendante du niveau de biomasse de la culture. Nous nous sommes placés dans des conditions de culture pour lesquelles l'interaction entre cellules, notamment pour l'accès à la lumière, restait limitée de manière à pouvoir se focaliser sur les mécanismes impliqués dans l'accumulation de

réserve. Néanmoins, pour prédire les productivités par unité de volume ou de surface de photobioréacteur, il faut disposer d'informations sur l'impact d'une diminution de la lumière moyenne (en cas de biomasse très élevée) sur les mécanismes de production et de stockage du carbone de réserve.

Chapitre 3

III. Réserves et production de lipides neutres en carence et en limitation azotée

Où il sera question :

- D'accumulation et de production de lipides et de sucres
 - De la différence entre carence et limitation
 - De productivité en huile
- De la modélisation de la production de lipide et de sucre

Sommaire

1. NEUTRAL LIPIDS AND CARBOHYDRATES PRODUCTIVITIES AS A RESPONSE TO THE NITROGEN STATUS IN THE HAPTOPHYCEAE <i>ISOCHRYSIS</i> SP. (T-ISO).....	113
1.1 Introduction.....	114
1.2 Material and Methods.....	116
1.3 Results	120
1.3.1 Experiment 1: N starvation and recovery.	120
1.3.2 Experiment 2: N limitation.	- 121 -
1.3.2 Relation between C storage and N quota.....	129
1.4 Discussion.....	130
1.4.1 Accumulation of C reserves in response to N limitation	130
1.4.2 NL accumulation versus production.....	132
1.4.3 Physiological functions and ecological advantages for reserves dynamics	134
1.4.4 Carbohydrate and neutral lipid productivity	135
2. MODELISER LA PRODUCTION D'HUILE PAR <i>ISOCHRYSIS</i> SP. DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE LIMITATION PAR L'AZOTE	137
2.1 Présentation du modèle.....	137
2.2 Optimisation de la productivité en huile des algues	138

Présentation du chapitre

La première partie de ce chapitre fait l'objet d'un article soumis à la revue *Journal of Phycology* et se focalise sur la relation entre le statut azoté et les productivités en huile et en sucre d'*Isochrysis* sp. placée dans différentes conditions de limitation azotée. Nous présentons ensuite un modèle mathématique qui a été construit en collaboration avec l'INRIA et qui permet de modéliser la croissance et l'accumulation de réserves par le phytoplancton au cours de carences et de limitations par l'azote (Mairet *et al.*, Bioressources and Technology, 2011).

Principaux résultats

Dans ce chapitre nous montrons que la relation entre la disponibilité en azote et la teneur en lipide n'est pas monotone, mais présente un caractère hystérétique. Les cellules d'*Isochrysis* sp. accumulent des lipides neutres transitoirement lors du passage d'une croissance forte vers une croissance faible. La limitation azotée en croissance équilibrée n'entraîne pas d'accumulation de lipides. On observe une relation linéaire décroissante entre le quota en sucre et en azote dans toutes les conditions de limitation azotée étudiées. Notre étude a également permis de déterminer les productivités en lipides neutres et en sucres dans différentes conditions de limitation azotée.

1. Neutral lipids and carbohydrates productivities as a response to the nitrogen status in the Haptophyceae

Isochrysis sp. (T-iso)

Thomas Lacour^{*1,2}, Antoine Sciandra^{1,2}, Amélie Gelay^{1,2}, Patrick Mayzaud^{1,2}, Olivier Bernard³

1- Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

2- Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

3- Comore, INRIA, BP93, 06 902 Sophia-Antipolis cedex, France

* Tel: +33 4 93 76 38 10; Fax: +33 4 93 76 38 48; E-mail: lacour@obs-vlfr.fr

Abstract

The partitioning of the Carbon (C) fixed during photosynthesis between neutral lipids (NL) and carbohydrates was investigated in the Haptophyceae *Isochrysis* sp. in relation to its nitrogen (N) status. Using batch and nitrate-limited continuous cultures, we studied the response of these energy reserve pools to both conditions of N starvation and limitation, respectively. During N starvation, NL and carbohydrate quotas increased but their specific growth rates decreased. When cells were successively deprived and then resupplied with NO₃, both carbohydrate and neutral lipid were inversely related to the N quota. These negative relationships were not identical during N impoverishment and replenishment, indicating a hysteresis phenomenon between N and C reserve mobilizations. Cells acclimated to increasing degrees of N limitation in steady state chemostat cultures showed decreasing NL quota and increasing carbohydrate quota. N starvation led to a visible but only transient

increase of NL productivity. In continuous cultures, the highest NL productivity was obtained for the highest dilution rate tested ($D = 1.0 \text{ d}^{-1}$), i.e. for non N-limited growth conditions, whereas the highest carbohydrate productivity was obtained at $D = 0.67 \text{ d}^{-1}$. We used these results to discuss the nitrogen conditions that optimize NL productivities in the context of biofuel production.

Key index words: biofuel, carbohydrate, neutral lipid, nitrogen limitation, phytoplankton, productivity, chemostat.

Abbreviations: C, Carbon; N, Nitrogen; NL, Neutral Lipid; NO_3 , Nitrate; TAG, triacylglycerol; PFD, photon flux density.

1.1 Introduction

Phytoplankton cells respond to environmental changes by adapting their physiology and growth rate. In terms of both content and composition lipids are, amongst other components, involved in microalgae acclimation. Some studies have shown that neutral lipids (NL) accumulation in phytoplankton is strongly dependent on growth conditions (Roessler 1990). Since the work of Spoehr & Milner (1949), lipid accumulation in response to nitrogen (N) limitation is often presented as an expected and well known response (Shifrin and Chisholm 1981, Livne and Sukenik 1992). However, several studies have also obtained other results. Shifrin and Chisholm (1981) reported that the lipid storage in response to nitrate (NO_3) or ammonium starvation is strongly species-specific. Among the 30 different species studied by these authors, some accumulated lipids while others accumulated carbohydrates only. Moreover, results from different studies carried out on a given species were also contradictory. Livne and Sukenik (1992) reported lipid accumulation in *Isochrysis galbana* in response to N starvation contrarily to Harrison *et al.* (1990) and Flynn *et al.* (1992). The dynamics and degree of N limitation (*i.e.*, partial limitation *vs.* starvation, or balanced *vs.* unbalanced growth) is an important feature, as suggested by the results of Richardson *et al.*

(1969) who reported lipid accumulation in N-starved cultures but not in N-limited steady state continuous cultures.

The effect of N limitation on lipid status is not straightforward as it can induce simultaneously a reduction of the lipid synthesis rate *per se*, and an increase of the lipid quota. These apparently paradoxical observations reported for *Isochrysis galbana* by Sukenik *et al.* (1991) and Livne and Sukenik (1992) suggest that accumulation of lipids by cell biomass unit can, in fact, result from the differential reductions of both the growth and lipid synthesis rates.

The aim of the present study is to investigate the influence of N availability on the dynamics of neutral lipids, principally triacylglycerols (TAG), and total carbohydrates, which are the two major reserves of carbon (C) and energy in phytoplankton. We attempt to clarify their respective responses to different kinds of N treatments, both in terms of cell content and production. In line with Rodolfi *et al.* (2009), we find it relevant to make the difference between N starvation and N limitation, because these two protocols may induce different physiological responses, notably at the level of lipid metabolism.

We thus carried out two different kinds of culture experiments with the Haptophyceae *Isochrysis* sp.. In a first experiment, we observed the time changes of different biochemical cell components (especially C reserves) in response to a NO₃ starvation period, followed by a NO₃ recovery period. In a second experiment, we performed the same measurements on a NO₃-limited continuous culture successively stabilized at different growth rates (*i.e.* degrees of N-limitation). In both cases, we were particularly interested in monitoring the dynamic transition from one state to the other.

During the last few years, the context of fossil fuel exhaustion promoted new research on phytoplankton lipids as a possible source for biofuel (Chisti 2007, Rodolfi *et al.* 2009). Focus was placed on microalgae screening in order to identify species with the highest lipid content (Griffiths and Harrison 2008, Rodolfi *et al.* 2009). Specific attention was given to the neutral lipid (NL) fraction (mainly TAG) which can be turned into biodiesel. The present study gives

new insights on the link between carbohydrate and lipid productivity, and growth conditions that allow inferring the best conditions for maximising lipid productivity through N limitation or starvation.

1.2 Material and Methods

Culturing system. *Isochrysis* sp., (clone T-iso, called Tahitian *Isochrysis*, CCAP 927/14) was used as unialgal culture. The culture vessels consisted of 5L water-jacketed cylinders connected to a circulating water bath at constant temperature ($22\pm0.1^{\circ}\text{C}$). The medium was prepared in 20L tanks (Nalgene) filled with $0.22\ \mu\text{m}$ Millipore-filtered natural seawater, and autoclaved at 110°C for 30 min. After cooling, sterile addition of nutrients was made according to the f/2 formulation (Guillard 1975), except for NO_3 which was added separately to the tanks. The renewing medium was injected into the culture vessels through a $0.22\ \mu\text{m}$ sterile filter (SpiralCap, Gelman) by peristaltic pumps (Gilson). When operating the cultures in continuous mode, the dilution rate (D , expressed in time^{-1} units) was periodically checked by weighing the incoming medium.

Two different culture modes were used: 1) N starvation/N recovery experiment (experiment 1) and 2) variable N-limitation experiment (experiment 2). In experiment 1, cell density increased during a batch phase (dilution rate equal to zero) before adjusting the dilution rate to the level of maximum growth rate to achieve constant densities. During the phase of stabilisation (turbidostat mode), the concentration of residual NO_3 remained high in the culture. This period of non-limited growth was ended by replacing the renewal medium by a medium without NO_3 . After six days of starvation, NO_3 was added both in the renewal medium and in the culture vessel to rapidly end NO_3 starvation (Figure 1A).

Experiment 2 was carried out in duplicate. The two cultures were grown under identical conditions of pH, temperature, light and nutrient, except at the end of the experiment (see below). After a non-limited growth period in batch mode, turbidostat mode was operated as

described above. Once cell density stabilized, the two cultures were operated in chemostat mode by reducing the dilution rate. The dilution rate was then adjusted step by step and successively maintained for several days at 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 d⁻¹ (Figure 2A). Changes were made when steady state was considered to be reached, *i.e.*, when cell biomass (cell number and total cell biovolume) has stabilized. Note that the time required for stabilization depended on the dilution rate, as steady state took longer to achieve at low growth rate, and *vice versa*). At the end of the experiment (on day 31), dilution rate was set to 0 d⁻¹ in culture 1 to impose the same conditions of N starvation as in experiment 1, whereas in culture 2, dilution rate was set to 0.4 d⁻¹.

In both experiments, continuous illumination was provided by two arrays of six 50 cm U-shaped, dimmable fluorescent tubes (Osram, Dulux®, 2G11, 55W/12-950, Lumilux de Luxe, daylight) placed on each side of culture containers. PFD was measured by a 2 Π spherical collector (QSL-100, Biospherical Instruments) immersed in the centre of the culture vessels. In experiment 1, light intensity was initially set at 350 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and was not readjusted later. For experiment 2, it was possible using a light controlling device to compensate daily for the variations of self-shading effects and to maintain a PFD of 430 ± 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The light spectrum and the photon flux density (PFD) controlling device are given in Bruyant *et al.* (2001).

All cultures were subjected to continuous gentle stirring and air bubbling to ensure homogeneity. pH was maintained at 8.2 in both experiments by automatic controlled-injection of CO₂ (for details see Sciandra *et al.* 2003)

Cell concentration and inorganic N. High frequency monitoring of the chemostat cultures was performed throughout the experiments to obtain real-time information on the major variables of the cultures. Cell concentration and size distribution were automatically measured hourly with an optical particle counter using the principle of light blockage (Hiac/Royco, Pacific Scientific Instruments). Parallel measurements were also performed daily with a

Multisizer 3 counter (Beckman) that allowed cross-validation of the Hiac size distributions. Cell concentration and biovolume were used to monitor time variation of the culture characteristics. This information was essential to ensure that cultures reached desired steady states, *i.e.* when growth rate was equal to the dilution rate. NO₃ and nitrite (NO₂) concentrations were measured every 2 hours with a Technicon Auto-analyzer coupled to an automated data-acquisition system (Bernard *et al.* 1996). This system served to check that cultures were not N-limited during the turbidostat mode.

Cellular elemental and biochemical analyses. The concentrations of particulate C and N were determined daily on triplicate samples. 10 mL of culture were filtered onto glass-fiber filters precombusted at 500°C for 12 hours. Filters were kept at 60°C before elemental analysis with a CHN analyzer (Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O). Carbohydrate and chlorophyll *a* (Chl*a*) concentrations were determined in duplicate or triplicate samples of 5 mL of culture filtered onto precombusted glass-fiber filters (Whatman GF/C). Total carbohydrate concentrations were analyzed by the phenol method (Dubois *et al.* 1956). *In vitro* Chl*a* was determined after extraction in a 2:3 mixture of dimethyl sulfoxide and 90% acetone (DMSO/acetone) using a Turner fluorometer (Model 10-AU-005-CE)(Shoaf and Lium 1976, Welschmeyer 1994).

Total lipids were quantitatively extracted using the method of Bligh and Dyer (1959). After 2 successive extractions of the tissue with a monophasic mixture of chloroform: methanol: water (1: 2: 0.8, v/ v), chloroform and water were added for phase separation. Lipids are present in the chloroform phase which is evaporated. All lipid extracts were stored at –80 °C until analysis. To avoid lipid auto-oxidation, a nitrogen atmosphere was continuously maintained. Separation of neutral and polar (glycolipids and phospholipids) lipids was achieved on a preparative scale by column chromatography on silica gel (Extract-Clean, Alltech). The neutral lipid (NL) fraction was eluted with six column volumes of chloroform. The NL fraction was evaporated and weighted.

Specific growth rates and productivity. The instantaneous specific variation rate of a component i having a bulk concentration C_i in the culture is:

$$\mu_i = \frac{1}{C_i} \cdot \frac{dC_i}{dt} + D \quad (\text{d}^{-1}) \quad (1)$$

This rate can be estimated from two discrete data measurements performed at times t_1 and t_2 by:

$$\mu_i = \frac{\ln\left(\frac{C_i(t_2)}{C_i(t_1)}\right)}{t_2 - t_1} + D \quad (\text{d}^{-1}) \quad (2)$$

In the following, μ_c is the C-specific growth rate; μ_{car} and μ_{NL} are the specific rates of variation of total carbohydrate and NL, called in this paper carbohydrate and NL growth rates respectively (even when they are negative). μ_{cell} is the cell division rate. At steady state, situation of balanced growth is obtained only when all these rates are equal to the dilution rate.

Carbohydrates and NL productivities normalized by C are calculated with the equation:

$$P_i = \mu_i \cdot \frac{C_i}{C_c} \quad (\text{mg.mg C}^{-1}.\text{d}^{-1}) \quad (3)$$

We find it more relevant to calculate productivities normalized by total Carbon ($\text{mg.mg C}^{-1}.\text{d}^{-1}$) instead of by culture volume ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) because C-normalised values are independent of the culture biomass level.

In the following, the N, carbohydrate, NL and Chla to C ratios are respectively called N, carbohydrate, NL and Chla quotas. Note that the behavior of volumetric (data not shown) and C-normalised (Figure 1E and 4) productivities was qualitatively very similar.

1.3 Results

1.3.1 Experiment 1: N starvation and recovery.

Figure 1A shows the time variations of NO_3 concentration and N quota as the culture was successively N-depleted (time 0) and N-resupplied (day 6). 12 hours after removing NO_3 from the renewing medium, NO_3 was completely exhausted in the bioreactor, yielding a N-starved culture as reflected by the marked decrease of the N/C ratio from 0.10 to 0.05mg/mg. After NO_3 reintroduction, N quota increased until a maximum value of 0.12 mg/mg, and finally stabilized at its initial value of 0.10 mg/mg. To prevent any possible N limitation during the recovery period, inorganic N was maintained above 30 μM by adding NO_3 each day to the culture vessel.

During the initial N-sufficient growth phase, the C-specific growth rate (μ_c) and cell division rate (μ_{cell}) were both stabilized at 0.7 d^{-1} (Figure 1B). N starvation led to a rapid decrease of these rates close to 0.0 d^{-1} . After NO_3 resupply, μ_{cell} and μ_c quickly increased and returned to their initial levels. From day 0 to day 13, μ_c was related to the N quota through the Droop relationship (Droop 1968) [$\mu = \mu' \cdot (1 - Q_{\text{min}}/Q)$], confirming that N was actually the growth limiting factor (Figure 4). Chl *a* quota showed a pattern similar to μ_{cell} .

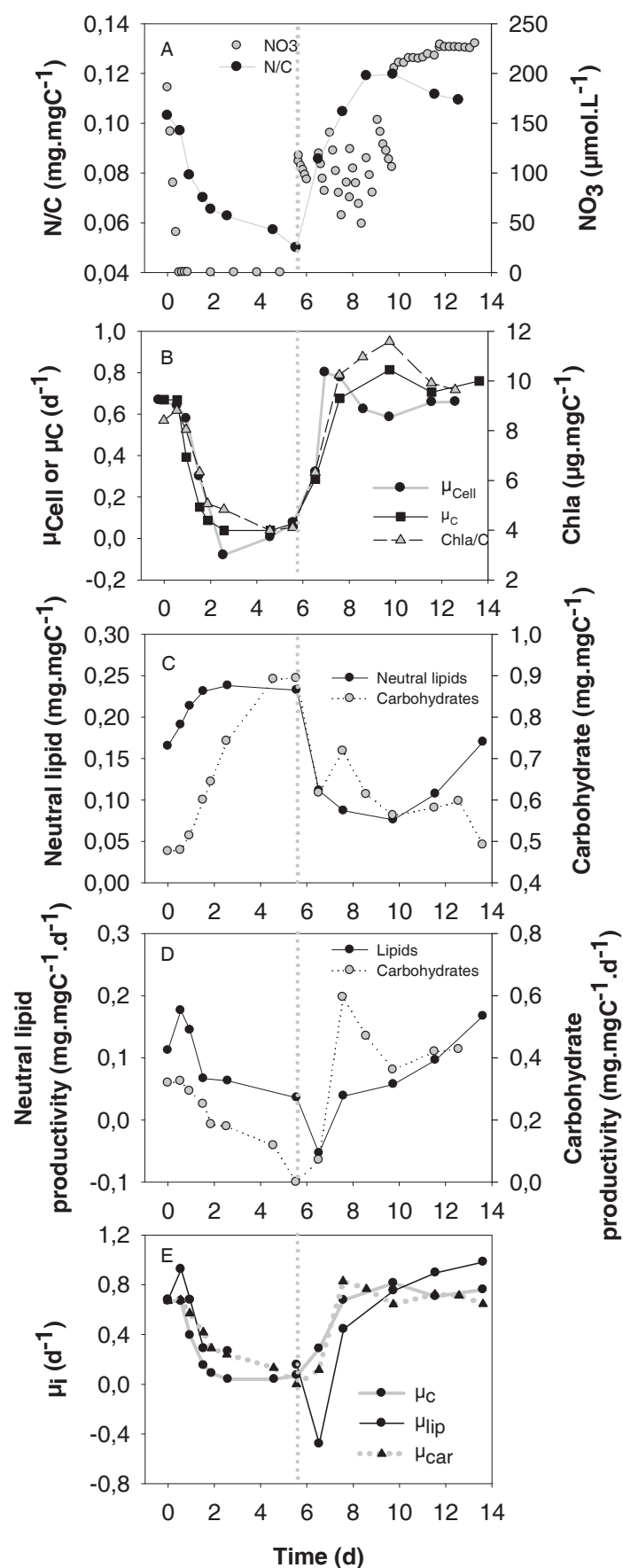


Figure 1: Experiment 1- NO_3 starvation/recovery experiment. The dotted lines indicate the transfer from batch to continuous mode. A) Time changes of N quota and NO_3 concentration; during recovery, NO_3 concentration was maintained above 30 μM by manual injections of NO_3 into the culture (days 6-10) and continuous supply thereafter. Time changes of: B) cell division rate, C-specific growth rate, and Chla quota; C) C-normalized NL and carbohydrate quota; D) carbohydrate and NL productivity; E) C, NL and carbohydrate specific growth rates.

During the phase of N starvation, NL quota increased by 45% from its initial value of 0.16 mg.mgC⁻¹ (Figure 1C). This accumulation was rapid (0.042 mg.mgC⁻¹.d⁻¹) during the first 36 hours, and stopped at day 2.6 to remain constant until the end of the starvation period. During the 4 days following N resupply, NL quota strongly decreased by 67% before recovering its initial level (0.17 mg.mgC⁻¹). Carbohydrate quota was 0.48mg.mgC⁻¹ during the initial N-sufficient growth period and increased by 87.7 % during N-starvation (Figure 1C). Notice that it took a longer time for the carbohydrate quota to stabilize than for the NL quota. After NO₃ addition, carbohydrate quota returned to its initial level.

Figure 1D shows that carbohydrate productivity decreased after N starvation (see also equation 3). NL productivity decreased only after 1 day of increase. The rest of the starvation led to very low productivity in C, NL and carbohydrates. NO₃ resupply led to the recovery of productivities measured during N-sufficient growth periods.

1.3.2 Experiment 2: N limitation.

The two duplicate cultures C1 and C2 showed very similar results for all the measurements, except at the end of the experiment when different dilutions were used for C1 (D=0.0 d⁻¹) and C2 (D=0.4 d⁻¹). NO₃ always remained below the detection limit for all the dilution rates, except for D = 1.0 d⁻¹ when concentration was maintained above 30 μM (Figure 2A). All the biochemical components measured in this study (cell density, particulate C and N, NL, carbohydrate) were affected by the changes in dilution rate before reaching new stable values after a transient period of acclimation.

Cell density. After 3 days of cell density stabilization at D=1.0 d⁻¹ (Figure 2B) (turbidostat mode: dilution rate adjusted to cell division, no nutrient limitation), the decrease of D from 1 to 0.2 d⁻¹ (day 2) led to a rapid reduction in NO₃ concentration below the detection limit (Figure 2A). The transition period between the two steady states can be divided into two periods. During the first 10 hours during where NO₃ was consumed but not growth limiting,

the division rate remained unchanged and cell density increased by 52 % (Figure 2A, 2B). During the second period, cell density decreased in the cultures due to N limitation and stabilized at day 7, suggesting that steady state conditions were presumably achieved. These time periods elapsed between two steady states are called “transient”. The successive increases in dilution rate led to successive reductions in cell density in the duplicate cultures C1 and C2 (Figure 2A). Cell density, and consequently growth rate, reached new steady states more rapidly at higher dilution rates. Note that 6 days after the changes of dilution effected on day 31 in C1 ($D=0 \text{ d}^{-1}$) and C2 ($D=0.4 \text{ d}^{-1}$), cell densities were not completely stabilized, and thus steady states were not achieved. During this experiment, cell density (and C concentration, data not shown) decreased as dilution rate increased as predicted by the chemostat theory (Sciandra and Ramani 1994, Bernard and Gouzé 2002).

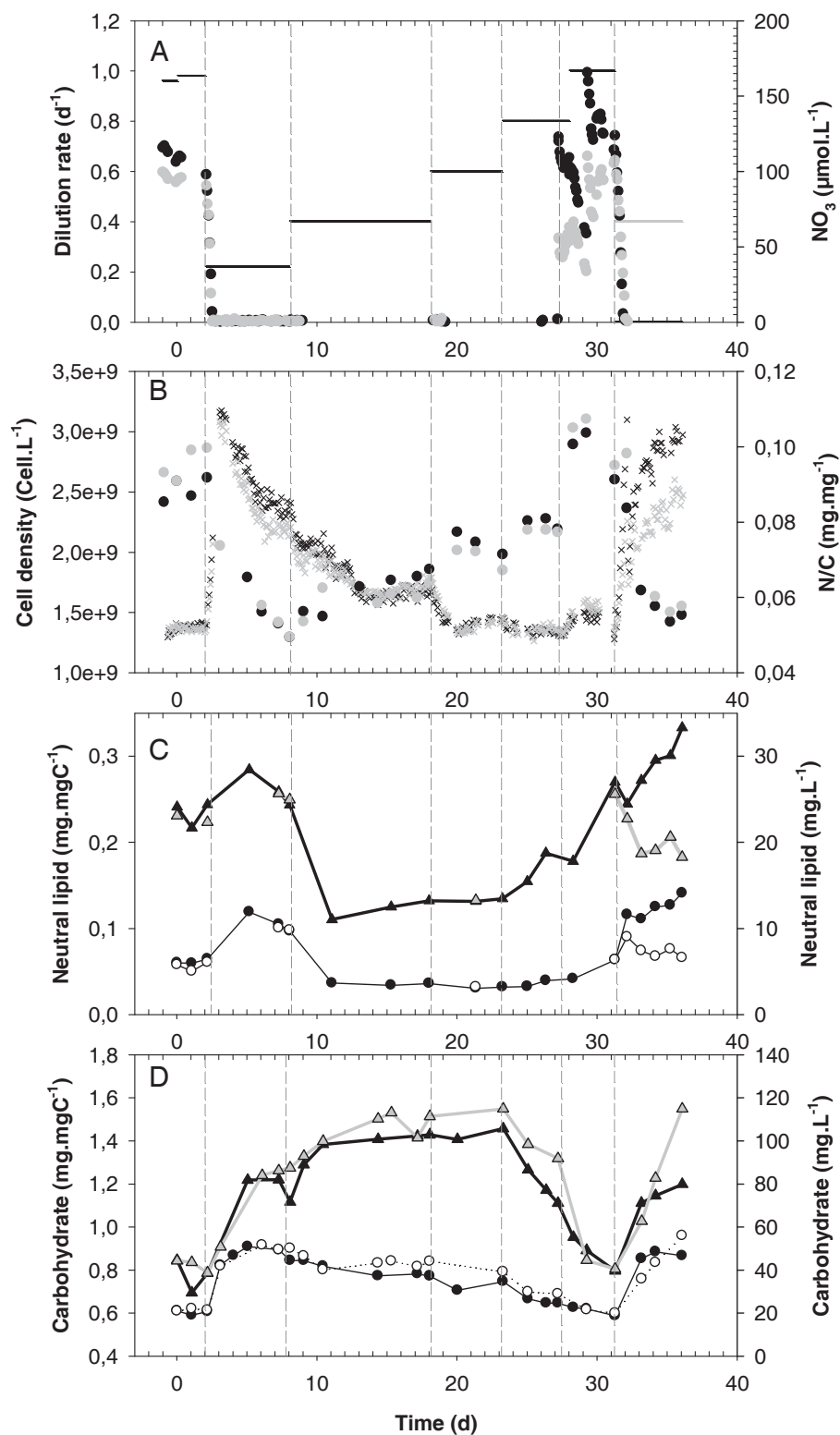


Figure 2: Experiment 2- NO₃ limitation experiment. Time series of A) NO₃ concentrations in cultures C1 (black circles) and C2 (grey circles), and dilution rates in C1 (black line) and C2 (grey lines). The last non-limited growth period began on day 27 by direct injection of NO₃ in the culture vessel, *i.e.*, one day before changing dilution rate; B) cell density in cultures C1 (black crosses) and C2 (grey crosses) and N quota in cultures C1 (black circles) and C2 (grey circles); C) NL concentration (C1, black circles and C2, grey circles) and quota (C1, black triangles and C2, grey triangles), D) carbohydrate concentration (C1, black circles and C2, grey circles) and quota (C1, black triangles and C2, grey triangles).

N quota. Figure 2B shows that N quota increased with dilution rate, as predicted by the cell quota model (Droop 1968). Figure 3 shows that steady state C-specific growth rate (μ_c) is well related to N quota by the Droop relationship, and that this relationship is less significant for measurements obtained at non steady states.

NL quota. During the initial non-limited growth period, NL quota was 0.24 mg.mgC^{-1} (Figure 2C). The reduction of D from 1 to 0.2 d^{-1} led to an important increase of the NL concentration (+ 84.5 %), mainly due to cell biomass increase as the NL quota increased only by 16.5 %. It is worth noting that this increase was only transient (Figure 2C). The NL quota was still decreasing as the dilution rate was changed on day 8, whereas biomass descriptors such as particulate C and cell number were stabilized. This observation suggests that, at this time, growth was not completely balanced, and that the reallocation of cellular C between the different storage compounds may occur a long time after the N perturbation. The successive dilution rate increases ($0.4, 0.6, 0.8 \text{ d}^{-1}$) led to modest increases in NL quota. NO_3 resupply on day 28 ($D = 1.0 \text{ d}^{-1}$) led to an increase of NL quota up to 0.25 mg.mgC^{-1} , close to the NL quota measured at the beginning of the experiment for identical growth conditions.

Subsequent NO_3 deprivation ($D = 0 \text{ d}^{-1}$) in C1 led to a small and transient decrease of the NL quota, followed by an important increase (+ 35.9 %). In C2, the dilution rate diminution (from 1.0 to 0.4 d^{-1}) led to a very different response. We observed an important decrease in NL quota (- 28.6 %) in 4.8 days without reaching the NL quota level recorded at the end of the 0.4 d^{-1} dilution period (between day 8 and 18).

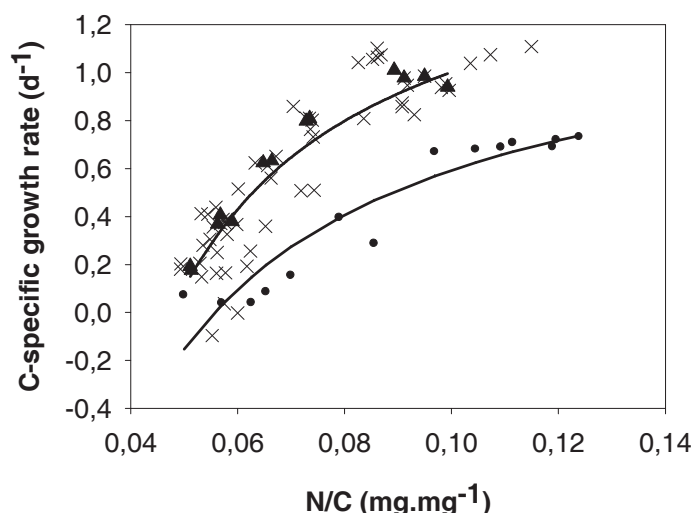


Figure 3: Relationships between C specific growth rate and N quota during the starvation/recovery experiment (black circles) and during the limitation experiment (Exp 2). Black crosses represent the whole sampling and black triangles only steady state growth samples. The Droop relationships [$\mu = \mu' \cdot (1 - Q_{\min}/Q)$] are fitted on steady state growth samples for Experiment 2 and for all samples for Experiment 1.

Carbohydrate quota. During the initial non-limited growth period of experiment 2, carbohydrate concentration and quota were equal to $20.86 \pm 0.98 \text{ mg.L}^{-1}$ and $0.80 \pm 0.06 \text{ mg.mgC}^{-1}$, respectively (Figure 2D). The dilution rate reduction from 1.0 to 0.2 d^{-1} led to a large increase of carbohydrate concentration (+ 131.8 %) and quota (+ 52.5 %). The carbohydrate quota was still increasing on day 8 when dilution rate was changed. The successive increases of D led to a reduction in carbohydrate concentration and quota. At the end of the non-limited growth period, on day 31, the carbohydrate quota and concentration returned to the levels observed at the beginning of the experiment when growth conditions were identical. At the end of the experiment, N starvation ($D=0 \text{ d}^{-1}$) in C1 and NO_3 limitation in C2 ($D=0.4 \text{ d}^{-1}$) led to increases in both carbohydrate concentration and quota.

Productivity. C-normalized NL productivity (Eq. 3) increased with C-specific growth rate (Figure 4A). Maximum productivity of NL was obtained at maximum growth rate, which is consistent with the observation of increasing NL concentration with increasing growth rate.

C-normalized carbohydrate productivity response (Figure 4B) was different because carbohydrate quota was decreasing with growth rate. The carbohydrate productivity increased with growth rate until 0.67 d^{-1} reaching the maximum productivity and then decreased.

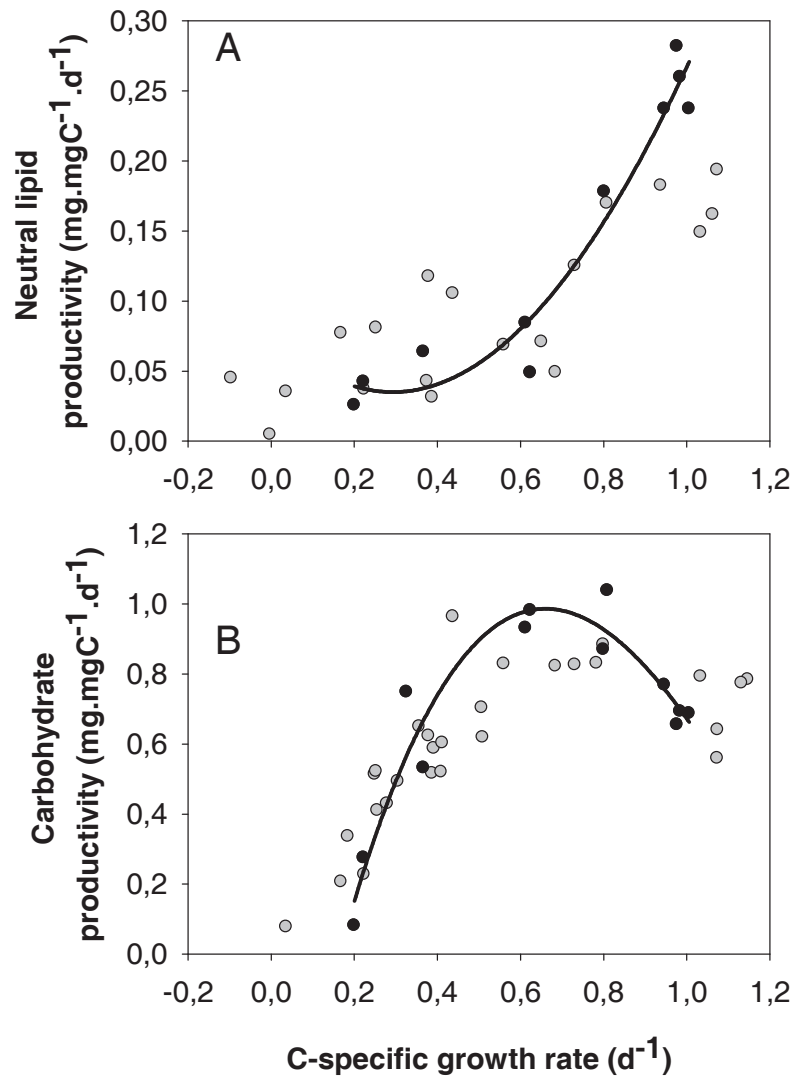


Figure 4: Experiment 2- NO_3 limitation experiment. Relationships between A) C-normalized NL productivity and C-specific growth rate, or B) between C-normalized carbohydrate productivity and C-specific growth rate, for transient data (grey circles), and steady state data (black circles). Polynomial curves are fitted to steady state data.

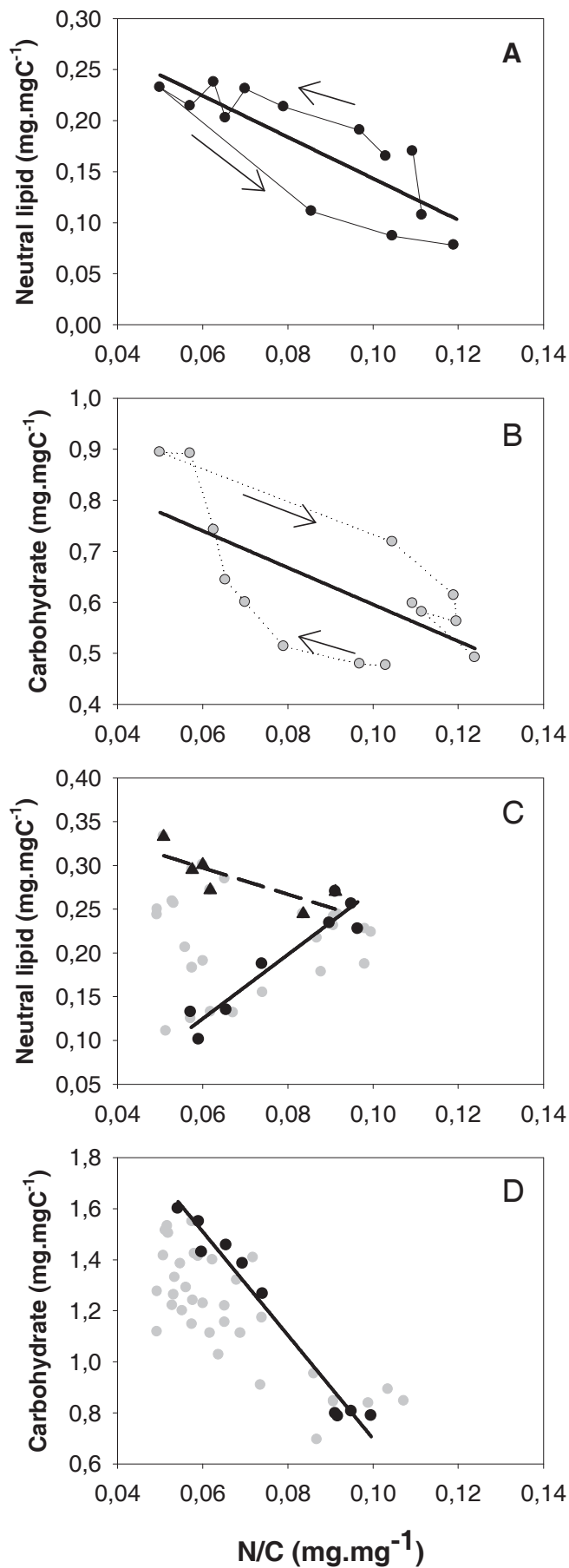


Figure 5: Experiment 1- NO₃ starvation/recovery experiment. Relationships between A) NL and N quotas; B) carbohydrate and N quotas (arrows indicate the sampling chronology). Experiment 2 – NO₃ limitation experiment. Relationships between C) NL and N quotas and D) carbohydrate quotas and N quotas. Steady state growth samples (black circles) and transient state samples (grey circles) are presented on this graph. In C black triangles represent the relationship between NL quotas and N quotas during NO₃ starvation in chemostat 1 during the last part of the experiment.

1.3.2 Relation between C storage and N quota.

Experiment 1. During the transient period following both N-starvation and N-recovery, negative linear relationships between N quota and both carbohydrate and NL quotas were observed (Figure 5A, 5B). Interestingly, data points are not randomly scattered around the regression lines but form a cycle which suggested a time-dependent hysteretic behaviour. In other words, the relationship between the N status and the C reserves depends on the cell history. Hysteresis is opposite for NL and carbohydrates. In response to both starvation and recovery, cell lipids change faster than cell N, while the opposite is observed for carbohydrates which have a slower dynamics than N. This pattern agrees with the hypothesis that both carbohydrate and NL quotas evolve differently during N deprivation and recovery.

Experiment 2. Figure 5C shows that the relation between the N status and the NL quota is not simple. During the unbalanced-growth period of NO_3 starvation at the end of the limitation experiment (Exp 2), the N status was negatively related to the NL quota, as already observed in the unbalanced-growth starvation experiment (Exp 1) but also in other N starvation studies (Livne and Sukenik 1992). Inversely, a positive linear relationship was observed when the balanced growth data for N and NL quota was measured at steady state only. The relationship between N status and NL quota appears thus to be dependent on the way that cells became N-limited.

A negative linear relationship between N and carbohydrate quotas could be shown, when only balanced growth periods were considered (Figure 5D). In our experiment where N was the only limiting factor, carbohydrate content directly depended on the limitation level of the cell, *i.e.*, the more important the limitation, the higher the carbohydrate content.

1.4 Discussion

1.4.1 Accumulation of C reserves in response to N limitation

N availability regulates the NL content of phytoplankton but as mentioned earlier, contradictory results have been reported that can be explained by different reasons. Besides the species specific difference in cell response to N limitation (Shifrin and Chisholm 1981), the differences of growing experimental conditions (medium, PFD, T°C and pH) can also account for the contradictions among studies reported in the literature. For example, in the present study, the higher PFD level used in Exp 2 compared to Exp 1 leads to higher accumulation rates of NL and carbohydrates in response to NO₃ deficiency. This is consistent with the study of Khotimchenko and Yakovleva (2005) who showed that cells exposed to higher light intensity contain more NL than cells exposed to low light. Another source of discrepancy can originate from the fact that pCO₂ conditions are generally not experimentally controlled. In such conditions, it cannot be excluded that the lipid response to N deprivation measured in some studies can also be biased by inorganic C limitation, notably in concentrated phytoplankton batch cultures.

Because of their facility in use, batch cultures have been preferred for a long time to investigate the lipid metabolism of phytoplankton and its response to N deficiency (Spoehr and Milner 1949, Shifrin and Chisholm 1981, Flynn *et al.* 1992, Livne and Sukenik 1992). However, the ever changing growth conditions experienced by phytoplankton in such closed culturing systems can also be responsible for the discrepancy found in the literature. Besides the effects of biomass accumulation on inorganic C exhaustion and self shading-induced PFD changes, the actual status of N-deprived cells is not known in evolving cultures, which can range from slight limitation to extreme starvation following N exhaustion. In this study, we showed that the protocol by which the cells were N-stressed influences the process of reserve

accumulation. In order to establish more clearly the relationship between NL accumulation and N status, we took the option of using continuous cultures to obtain stabilized levels of N limitation. The concept of single nutrient limitation has been formalized by the internal quota model (Droop 1968), which hypothesizes that growth depends on the amount of only one internal limiting nutrient. The Droop relationship fits correctly to steady state data acquired during the limitation experiment (Exp 2), and, to a lesser extent, to the data acquired during the transient states of both limitation (Exp 2) and starvation (Exp 1) experiments (Figure 3). The fact that Droop relationships differ between the two experiments is explained by the different levels of PFD used. In the starvation experiment conducted at lower PFD, the Droop relationship is shifted to the right due to a lower maximum growth rate and a higher N subsistence quota. This shift reflects a growth compensating phenomena by which cells adapt to light limitation by increasing their N quota (Sciandra et al. 1997, Sciandra et al. 2000). Despite this difference, it can be considered that N was actually the only growth controlling factor in both experiments.

Results of Exp 1 and 2 agree with earlier studies showing that NO_3 starvation triggers accumulation of NL in phytoplankton cells (Spoehr and Milner 1949, Livne and Sukenik 1992). However, results obtained under our N-limited balanced growth conditions (Exp 2) differ from those of Sukenik & Livne (1991) and Saoudi-Helis *et al.* (1994). These latter studies reported that low growing, N-limited cells (low N quota) accumulated more lipids than rapidly growing cells (higher N quota), whereas a positive linear relationship between N-limited growth rate and NL content was observed in the present study (Figure 5C). Such a discrepancy can be related to *Isochrysis* strain differences as shown by Sayegh *et al.* (2007). However, it is most probable that an actual steady state was not reached and that insufficient time prevented the establishment of a true balanced growth state. Indeed, as shown in the present study, the time necessary to reach balanced growth conditions was quite long,

particularly at low dilution rates. In the cited studies, samples for analysis were taken after “several days prior to measurement” (Suknik and Livne (1991) at a given dilution rate, or “after 2-5 complete renewals of the medium” (Saoudi-Helis *et al.* 1994) as stated by the authors. We showed here that when D was reduced from 1.0 to 0.2 d⁻¹, a steady state was not completely achieved until after 6 days, and that the NL quota was still high. Contrary to NL, the carbohydrate relationship with N availability appears more straightforward, as already reported by different authors (Harrison *et al.* 1990, Fábregas *et al.* 1995, Lynn *et al.* 2000). Carbohydrate accumulation in response to decreasing NO₃ availability seems to be a very recurrent pattern for many species. In our study we observed a clear negative linear relationship between N and carbohydrate content both in N-starved and N-limited conditions.

1.4.2 NL accumulation versus production

The high frequency sampling used in this study allowed us to compute the instantaneous specific growth rates of carbohydrate (μ_{car}) and NL (μ_{NL}), as well as their productivity. Equations (1) for NL and C allow inferring the relationship existing between NL quota ($H_{NL}=C_{NL}/C_C$) variation and NL specific growth rate (μ_{NL}). By taking the derivative, substituting and rearranging, we get:

$$\begin{aligned}\frac{dH_{NL}}{dt} &= \frac{d}{dt} \left(\frac{C_{NL}}{C_C} \right) = \frac{1}{C_C} \cdot \frac{dC_{NL}}{dt} - \frac{C_{NL}}{C_C^2} \cdot \frac{dC_C}{dt} \\ &= H_{NL} \cdot \frac{1}{C_{NL}} \cdot \frac{dC_{NL}}{dt} - H_{NL} \cdot \frac{1}{C_C} \cdot \frac{dC_C}{dt}\end{aligned}\quad (4)$$

As a consequence, using the equation of μ_c , we obtain:

$$\frac{dH_{NL}}{dt} = (\mu_{NL} - \mu_C) H_{NL} \quad (5)$$

The same relation can be established for carbohydrates:

$$\frac{dH_{car}}{dt} = (\mu_{car} - \mu_c)H_{car} \quad (6)$$

Eq. 5 and 6 illustrate that NL or carbohydrates are accumulated when their specific rate of production is higher than the C-specific growth rate. When $\mu_{NL}=\mu_{car}=\mu_c=D$, dH_i/dt is equal to 0 and the culture is in a state of balanced growth.

On the long term, N starvation leads to a decrease in the specific growth rates of C, carbohydrates and NL (Figure 1E). Consequently the observed increase in NL quota (Figure 1C) mainly results from a differential decrease between NL and C specific growth rates. The same holds for carbohydrates. NL and carbohydrates accumulate relatively to C because NL production slows down less rapidly than that of total C. The transition from non-limited growth to highly limited growth ($D = 0.2 \text{ d}^{-1}$) in experiment 2 (data not shown) led to the same conclusions.

Recovery from starvation (Figure 1E) led to an increase in specific growth rates of both carbohydrate and C. The decrease in carbohydrate quota after N recovery (Figure 1C) resulted from the differential increases in C and carbohydrate specific growth rates. Respiration processes can explain the NL quota decrease after recovery (NL net specific growth rate became negative just after recovery) and differential increase in synthesis rates between NL and C.

Finally, transient variations of NL quota were mainly related to a delay in acclimation to new growth conditions. This delay was responsible for the hysteretic behaviours described in Figure 5. Livne and Sukenik (1992) showed that *in vitro* activity of *Isochrysis galbana* acetylCoA carboxylase (ACCase), a key regulatory enzyme of fatty acid biosynthesis, decreased during N starvation and increased during recovery. They suggested that changes in total lipid quota were due to differences between total lipid synthesis and division rate, in line with our present results. We can conclude that accumulation of NL by *Isochrysis* sp. cells is

not the result of an active enhancement of lipid synthesis but the result of a differential decrease. These observations have important consequences on NL productivity, as we will see below.

1.4.3 Physiological functions and ecological advantages for reserves dynamics

Microalgal cells have developed different mechanisms to survive and optimize their growth in environments subjected to strong variations in physico-chemical conditions. The present study illustrates the functions of NL and carbohydrates in cell adaptation to varying N conditions. The onset of a N-limitation period leads to a metabolic imbalance between continuing photosynthetate production and declining growth rate, and induces an important oxidative stress. Cells have to readjust their photosynthetic activity to the level of energy required by new growth conditions. The decrease of Chl a quota observed during the period of N starvation (Figure 1B) is one aspect of the photosynthetic apparatus acclimation to low growth rates (Sciandra *et al.* 1997). We showed that during NO $_3$ starvation, NL and carbohydrate were both accumulated (at different rates). The accumulation of C reserves can be interpreted as a way to channel excess C and reducing power (NADH, NADPH) during metabolic imbalance.

After NO $_3$ resupply, some differences were observed: NL quota reached very low values, *i.e.* lower than for unlimited growth (Shifrin and Chisholm 1981, Livne and Sukenik 1992, Khozin-Goldberg *et al.* 2005). Carbohydrates did not present such a pattern, and simply recovered their initial level. In this study, we analysed total carbohydrates which comprise structural carbohydrates which are not mobilized when growth restarts. This could explain some of the differences observed between NL and carbohydrate dynamics during recovery. It is commonly accepted that N replenishment triggers the respiration of NL and/or carbohydrates that, by producing energy and reducing power, enhances growth (Murphy

2001). Some authors (Khozin-Goldberg *et al.* 2005) also showed that NL may also serve as an internal buffering system that can rapidly provide specific acyl groups, *e.g.* EPA for new synthesis of cell membranes after N-recovery.

Results of Exp 2 also showed that carbohydrates and NL in *Isochrysis* sp. respond differently to different levels of N-limitation. Indeed, in conditions of balanced growth, NL are not accumulated because the fatty acid biosynthesis pathway is highly down-regulated by N-limitation (Sukenik and Livne 1991). High carbohydrate content observed under N-limited growth can be interpreted as a consequence of the low synthesis of fatty acids. Indeed, the synthesis of fatty acids constitutive of cell membranes and TAGs requires high amounts of energy (ATP) and reducing power (NADPH) provided by photosynthesis and by the oxidation of carbohydrates through the pentose phosphate pathway (Berg *et al.* 2003). Some authors suggested that under limited growth, the requirement for fatty acids being smaller, a part of the carbohydrates that was catabolized are now accumulated (Halsey *et al.* 2010).

Carbohydrate and particularly NL are essential buffers for algal acclimation to changing growth conditions and help microalga to optimize their growth in fluctuating environments. NL are used more as buffers during transient unbalanced growth periods than carbohydrate whose concentration directly depends on the N limitation level. These functional hypotheses have been taken into account in a phenomenological mathematical model described in Mairet *et al.* (in Press). Able to fit correctly to the time variations of experimental observations, this model supports the hypothesis put forward, and also serves to define the protocols of N limitation optimizing NL production by *I. galbana*.

1.4.4 Carbohydrate and neutral lipid productivity

One of the key points for biodiesel production is the ability for a given species to produce a given quantity of NL per unit time (Griffiths and Harrison 2008, Rodolfi *et al.* 2009). However, most of the studies conducted on microalgae have focused their analyses on cell

lipid content without considering their growth rate. This is unfortunate since phytoplankton species generally accumulate lipids under stressing conditions which hamper their growth rate, and potentially their lipid productivity. As already evoked by Sheehan *et al.* (1998), high lipid content and high productivity seem to be mutually exclusive for a given species. Our study firmly demonstrates that high biomass production and high NL contents are not compatible, at least for *Isochrysis* sp., and that the highest NL productivity in continuous cultures is obtained in absence of N limitation. During N starvation in batch cultures, NL accumulates and NL productivity increases but, as biomass productivity decreases rapidly, this increase is only transient. Starvation is the only condition promoting both NL content and productivity. These results suggest that a two phase strategy could be used for oil production by *Isochrysis* sp.: a non limited-growth period followed by a short starvation period allowing biomass enrichment in oil. Rodolfi *et al.* (2009) proposed the same two step strategy using other protocols and other species.

Our results also show that the response of carbohydrate productivity to N-limitation differs from the NL response. Although carbohydrate content decreased with growth rate, we were able to find a trade-off between growth and carbohydrate content enhancing productivity for N-limited conditions in continuous cultures. Hence, it was possible to produce continuously more carbohydrates in N-limited cultures than in non limited cultures.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Shamash project (ANR-06-BIOE-014), the Conseil Général des Alpes-Maritimes, and by the EDD department of CNRS.

2. Modéliser la production d'huile par *Isochrysis* sp. dans différentes conditions de limitation par l'azote

2.1 Présentation du modèle

Un modèle (Mairet *et al.* 2011, Annexe 3) a été construit dans le but de prédire et d'optimiser la production de TAG en photobioréacteur. Ce modèle permet de décrire la croissance et l'accumulation de lipides et de sucres des algues à l'équilibre et dans les transitoires. Il permet de modéliser les dynamiques de croissance et d'accumulation des algues dans de nombreuses conditions de croissance, depuis la faible limitation par l'azote à la carence complète. Ce modèle, qui est basé sur le principe du modèle de Droop est simple, et donc analysable mathématiquement. Il permet aussi de comprendre et de valider certaines hypothèses du chapitre 1 comme le phénomène d'hystérésis qui est responsable de l'accumulation des lipides en carence. Il valide aussi nos hypothèses sur les interactions entre les lipides neutres et les sucres (Figure 7). Il est, à notre connaissance, le premier modèle traitant de la synthèse et de l'accumulation de lipides neutres et de sucres par des microalgues.

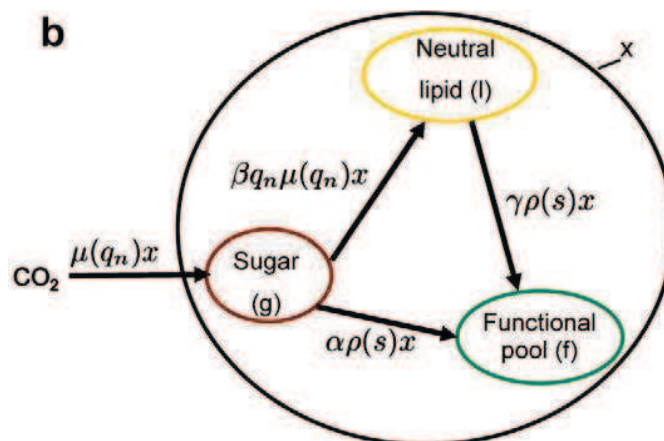


Figure 7: Représentation du flux de carbone selon le modèle de Mairet et al. (2011). La dynamique des lipides neutres résulte d'un déséquilibre entre la synthèse de sucre et leur propre mobilisation pour la croissance. Cette figure est extraite de Mairet *et al.* (2011).

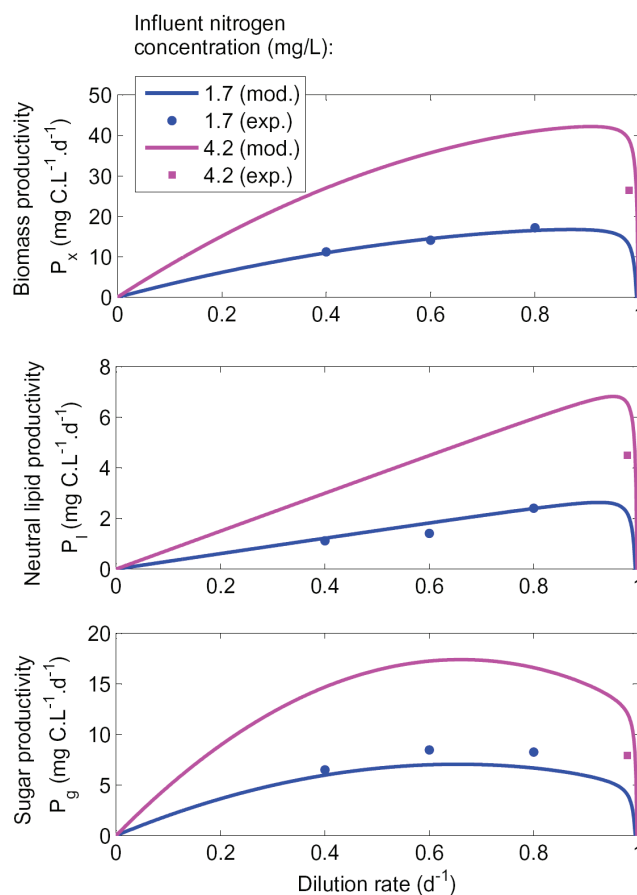


Figure 8 : Productivité en biomasse, en sucre et en lipide neutre d'une culture d'*Isochrysis* sp. :

Comparaison entre les sorties du modèles (lignes) avec les données expérimentales (Points) pour différents $S_{in} = 1,7\text{mg.L}^{-1}$ (bleue) et $S_{in} = 4,2\text{mg.L}^{-1}$ (magenta). Le S_{in} est la concentration en azote du milieu de renouvellement. Cette figure est extraite de Mairet *et al.* (in Press).

2.2 Optimisation de la productivité en huile des algues

Le modèle prédit correctement les productivités obtenues expérimentalement en culture en continu (Figure 8). Il prévoit une productivité en lipides neutres maximale pour des taux de croissance de 0.95 j^{-1} c'est-à-dire à des valeurs proches du taux de croissance maximal. Il prévoit aussi correctement le maximum de productivité en sucre.

Pourtant ce modèle présente différentes limites, qu'il faudra dépasser pour modéliser correctement la production de lipides neutres et de sucres dans **des conditions réelles**. Tout d'abord les expériences sur lesquelles s'appuie le modèle ont été réalisées à de faibles concentrations en biomasse pour éviter différents biais liés à l'auto ombrage des cellules ou au gradient de lumière dans le chémostat. La prédiction des productivités maximales en biomasse, en lipides neutres et en sucres pour des cultures à hautes densités de biomasse nécessitera une prise en compte du gradient de lumière en modélisant le transfert radiatif dans le système de culture (Pruvost *et al.* 2009).

Ensuite, la modélisation de la production de lipides neutres en deux étapes que nous proposons (croissance non limitée puis enrichissement en huile de la biomasse en carence) et qui pourrait permettre d'optimiser la production en huile est, d'un point de vue théorique, assez complexe et n'a pas encore été réalisée (Mairet *et al.* 2011). La prise en compte de la lumière est également nécessaire pour cette étape de raffinement du modèle.

Pour finir, le modèle proposé repose sur des expériences réalisées en lumière continue. La lumière naturelle présente des oscillations J/N qui ont une influence importante sur la physiologie des algues (Prezelin 1992) et sur la gestion des réserves énergétiques (Sicko-goad *et al.* 1988). De nouvelles expériences sont donc nécessaires pour étudier l'influence des cycles diurnes sur la synthèse des lipides neutres et des sucres. Ce sera l'objet du chapitre 5.

Chapitre 4

IV. Projet Shamash : Les huiles du phytoplancton comme source de biocarburant

Où il sera question :

- De la qualité des huiles produites
- De la modification de leur composition induite par une carence en azote



Les algues sont récoltées par filtration et transportées sur un tapis roulant de la Cyanotech Corporation (www.cyanotech.com), Hawaii, USA. Photograph by Terry Luke. Extrait de Chisti (2007).

Sommaire

1. INTRODUCTION : LE PROJET SHAMASH	145
2. QUALITE DES HUILES PRODUITES : LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE 4 ESPECES DE PHYTOPLANKTON.....	146
2.1 La composition en acides gras des lipides neutres et lipides totaux.....	147
2.2 L'huile d'algue comme biodiesel ?.....	149
3. INFLUENCE D'UNE CARENCE EN AZOTE SUR LA COMPOSITION DES HUILES PRODUITES.....	151

1. Introduction : Le projet Shamash

On assiste ces dernières années à une augmentation rapide de la pression partielle du CO₂ dans l'atmosphère et de la température moyenne à la surface de la terre. Ces transformations, qui sont en partie attribuées à l'activité anthropique, se révèlent préoccupantes à plusieurs titres, conduisant nos sociétés à développer des sources d'énergie alternatives moins émettrices en CO₂. Parmi elles, la production de triglycérides par les microalgues et leur transformation en biocarburants est une filière dont le potentiel fait l'objet de nombreuses études à travers le monde, et plus particulièrement au sein du programme ANR **Shamash**. Les microalgues possèdent certaines caractéristiques avantageuses par rapport aux plantes terrestres que de nombreux auteurs mettent en avant (Chisti 2007, Huntley and Redalje 2007) pour justifier leur fort intérêt pour la production de biocarburant :

- des taux de croissance importants et par conséquent des productions à l'hectare supérieures à celles des espèces terrestres,
- une plasticité métabolique bien plus importante permettant de favoriser la production de certains acides gras ou de coproduits valorisables,
- une maîtrise possible du cycle de l'azote et du phosphore en contrôlant le recyclage des éléments nutritifs,
- une production qui n'accapare pas de foncier agricole aux dépens de l'agriculture conventionnelle.

Le projet Shamash regroupe plusieurs équipes de recherche qui s'intéressent à différents aspects de la production d'huile par les algues. Notre équipe a étudié l'influence de certaines conditions environnementales sur cette production, notamment la disponibilité en azote (Chapitre 3), et les cycles lumineux diurnes (Chapitre 5). Dans le présent chapitre, nous nous

intéressons aux applications « biocarburant » du travail réalisé. Nous présentons ici les travaux que nous avons réalisés sur la qualité des huiles produites par le phytoplancton et sur la manière dont celle-ci est modifiée par une carence en azote.

2. Qualité des huiles produites : la composition en acides gras de 4 espèces de phytoplancton

La trans-estérification d'une huile (TAG) produit des mono-alkyl-esters qu'on appelle biodiesels. Comme l'alcool choisi pour l'estérification est souvent le méthanol, le biodiesel est constitué d'Esters méthyliques d'huiles végétales (EMHV). Les propriétés d'un biodiesel sont principalement déterminées par la structure des acides gras qui le composent (Knothe 2005). Ainsi, la composition en acides gras des huiles produites par le phytoplancton est un paramètre important pour leur utilisation comme biocarburant. Par exemple, les acides gras saturés produisent un biodiesel avec un meilleur indice de cétane et une meilleure stabilité à l'oxydation, mais avec des propriétés (ex : fluidité) qui se dégradent à faible température (Hu *et al.* 2008).

L'introduction des biodiesels d'origines diverses (huiles alimentaires usagées, huiles végétales ...) a été accompagnée par le développement de normes qui assurent la qualité du produit (Knothe 2005). La norme européenne pour les biocarburants (EN 14214) (Schober and Mittelbach 2007) définit des critères et des caractéristiques des EMHV qui doivent être respectés pour une utilisation comme biocarburant. Nous avons donc analysé les compositions en AG de 4 espèces de phytoplancton très différentes, issues de 3 classes phylogénétiques (1 diatomée, 1 Prymnesiophyceae, 2 Chlorophyceae) et provenant d'environnements marins, d'eau douce ou même d'environnements terrestres. Nous avons caractérisé les huiles de ces algues pour déterminer si elles peuvent être utilisées en tant que biocarburant.

2.1 La composition en acides gras des lipides neutres et lipides

totaux

La plupart des travaux qui ont examiné la possibilité de produire un carburant à base d'algue se sont basés sur l'analyse des lipides totaux. Pourtant, ce sont généralement les TAG qui sont utilisés pour produire du biodiesel, et leur composition ne correspond pas toujours à la composition des lipides totaux. Nous avons donc analysé à la fois la composition des lipides totaux et des triacylglycerols.

De manière évidente, plus la proportion de TAG dans les lipides totaux est élevée, plus les compositions des lipides totaux et des TAG sont proches (Tableau 1). Les échantillons de *Neochloris oleoabundans* et d'*Isochrysis* sp. possèdent de faibles proportions de TAG (6.2 % et 28.8 % des lipides totaux respectivement) et ont des TAG et des lipides totaux aux compositions en AG assez différents (Tableau 1). Pour ces algues et dans ces conditions de croissance, l'analyse de la composition des lipides totaux ne suffit pas pour caractériser finement la composition des huiles à vocation biocarburant et une séparation préalable des lipides neutres est nécessaire.

Les échantillons de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Cylindrotheca closterium* sont très riches en TAG (54.6% et 72.5% respectivement) ce qui explique les similitudes entre les compositions des TAG et des lipides totaux. Les acides gras des TAG sont généralement moins insaturés que les autres classes de lipides (Hu *et al.* 2008). Pourtant, ces deux espèces ont des TAG plus insaturés que les lipides totaux.

Tableau 1 : Compositions en acides gras (% du total) et taux d'insaturation des lipides totaux et des TAG de 4 espèces de phytoplancton en carence en azote. Pour le calcul du taux d'insaturation voir chapitre 2, section 6.1.4.

	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		<i>Isochrysis</i> sp.		<i>Neochloris oleoabundans</i>			<i>Cylindrotheca closterium</i>	
Acide gras	Lipides totaux	TAG	Lipides Totaux	TAG	Lipides Totaux	TAG	FFA	Lipides Totaux	TAG
14:0	0,3	0,4	26,6	19,2	1,2	0,9	1,8	8,8	7,5
ISO 17:0	0,5	0,3	-	-	1,4	1,9	0,9	-	-
16:0	29,9	24,7	15,9	15,2	36,3	20,0	15,4	38,8	35,7
18:0	4,4	4,9	3,5	6,6	1,9	4,0	5,5	0,8	0,6
22:0	0,1	0,1	0,9	1,4	-	-	-	-	-
24:0	0,1	0,1	-	-	0,2	0,3	0,4	-	-
16:1transδ^3	3,7	4,0	0,1	0,1	2,2	1,6	2,2	-	-
16:1ω7	-	-	1,2	0,6	4,2	3,6	11,5	26,7	26,1
16:1ω5	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,6
18:1ω9	9,0	11,3	22,9	33,0	11,8	40,5	12,0	6,8	6,8
18:1ω7	7,0	6,6	1,4	0,6	10,3	3,3	5,2	0,3	0,2
20:1ω9	0,3	0,4	-	-	0,1	0,2	0,2	-	-
16:2ω7	1,6	1,8	-	-	2,9	1,3	4,1	-	-
18:2ω6	10,4	11,9	6,5	11,2	14,6	16,5	15,5	2,3	2,6
16:3ω6	0,4	0,5	-	-	-	-	-	-	-
16:3ω3	3,1	4,0	-	-	-	-	-	-	-
18:3ω6	-	-	-	-	1,3	1,3	11,2	1,8	2,1
18:3 ?	9,4	7,8	-	-	-	-	-	-	-
18:3ω3	11,6	12,3	2,1	0,7	5,4	1,6	7,8	-	-
16:4ω3	4,6	5,6	-	-	-	-	-	-	-
20:3ω6	-	-	-	-	-	-	-	1,2	1,7
18:4ω3	-	-	5,0	2,6	-	-	-	0,4	0,6
20:4ω6	-	-	0,2	0,5	-	-	-	4,8	6,6
18:5ω3	-	-	1,4	0,5	-	-	-	-	-
20:5ω3	-	-	0,4	0,5	-	-	-	2,9	5,5
22:5ω6	-	-	1,2	0,3	-	-	-	0,2	0,1
22:6ω3	-	-	6,7	3,7	-	-	-	0,1	0,2
Insaturation	0.77	0.86	0.33	0.26	0.41	0.28	0.77	0.16	0.25

Les acides gras des microalgues sont généralement très peu ramifiés. Les 4 espèces de phytoplancton analysées ici ne possèdent que peu ou pas (sous la limite de détection) d'AG ramifiés. Par contre les TAG de ces espèces se distinguent à la fois par la longueur des chaînes carbonées de leurs acides gras et par leur insaturation (Tableau 1 et 2). *Neochloris oleoabundans* et *Chlamydomonas reinhardtii* ne possèdent pas d'acide avec des longueurs de chaîne supérieures à 18:3 ω 3. *Isochrysis* sp. et *Cylindrotheca closterium* montrent des spectres plus classiques pour les microalgues marines. Des PUFA dominent les profils totaux et les TAG : l'EPA (20:5 ω 3) chez la diatomée et le DHA (22:6 ω 3) chez la prymnesiophyte

2.2 L'huile d'algue comme biodiesel ?

Les propriétés d'un biocarburant sont très influencées par les acides gras qui le composent. Les 3 paramètres les plus importants sont la longueur des chaînes, le degré d'insaturation et les ramifications des acides gras (Knothe 2005). Généralement, il est admis que l'indice de cétane, la température de fusion, le pouvoir calorifique et la viscosité augmentent avec la longueur de chaîne alors qu'ils diminuent avec le degré d'insaturation.

Excepté *Chlamydomonas reinhardtii*, les microalgues analysées ont des taux d'insaturation proches de ceux du colza qui est une huile couramment utilisée pour la production de biocarburant (Tableau 2). Il est théoriquement possible de calculer les valeurs de certains indices de la norme EN 14214 à partir de la composition en acide gras des TAG (Tableau 2). Tout d'abord, la norme EN 14214 impose des indices d'iode inférieurs à 120. Trois des quatre algues analysées respectent ce critère (*Isochrysis* sp., *Neochloris oleoabundans* et *Cylindrotheca closterium*). Les 4 algues possèdent un indice de cétane qui respecte la norme. La viscosité cinématique à 40°C des 4 huiles analysées est assez faible, ce qui s'explique par les fortes proportions d'acide gras polyinsaturés. *Isochrysis* sp. et *Neochloris oleoabundans* respectent la norme au sens strict, même si les 2 autres espèces possèdent une viscosité très

proche de la valeur minimum autorisée. Les teneurs en acides gras avec plus de 4 insaturations sont trop fortes chez *Isochrysis* sp., *Chlamydomonas reinhardtii* et *Cylindrotheca closterium*. *Cylindrotheca closterium* est la seule espèce qui possède une teneur en linoléate inférieure à la valeur minimale acceptable.

	Norme EN 14214	Colza	<i>Isochrysis</i> sp.	<i>Neochloris oleoabundans</i>	<i>Cylindrotheca closterium</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Insaturés (%)	-	7	42.41	27.00	43.76	30.62
Monoinsaturés (%)	-	59	34.31	46.06	33.62	22.32
Polyinsaturés (%)	-	32	20.08	20.72	19.43	45.54
Taux d'insaturation	-	0.33	0.21	0.22	0.20	0.46
Indice d'iode	<120	97-107	83	81	92	130
Indice de cétane	>51	45-60	61	57	62	54
Viscosité cinématique à 40°C (mm ² .s ⁻¹)	3.5<V<5	3.7	3.5	3.8	3.3	3.1
Polyinsaturés >4 (%)	<1	0.0	8.2	0.0	13.0	5.6
Linoleate (%)	<12	20.0	11.2	16.5	2.6	11.9

Tableau 2 : Caractéristiques des TAG de 4 espèces d'algues, de l'huile de colza couramment utilisé comme biodiesel et de la norme EN 14214. L'indice d'iode d'un corps gras est la masse de diiode exprimée en gramme fixée par 100g de ce corps gras en solution dans le chloroforme. L'indice de cétane a été calculé en utilisant la méthode proposée par Bamgboye et Hansen (2008). La viscosité cinématique a été calculée en utilisant la méthode proposée par Allen *et al.*(1999).

On peut donc conclure que, comme de nombreuses huiles à vocation biodiesel, les huiles issues des algues ne respectent pas tous les critères de la norme européenne, car elles présentent des taux d'insaturation trop importants. Il faudra donc faire un choix d'espèce qui possède des acides gras moins insaturés que ceux des algues analysées ici. Une autre solution pourrait être d'orienter la composition en acide gras des huiles en modifiant les conditions environnementales.

3. Influence d'une carence en azote sur la composition des huiles produites

Nous avons montré qu'une carence en azote permettait d'augmenter la teneur en huile d'*Isochrysis* sp., à l'instar de Shifrin et Shisholm (1981) pour de nombreuses autres espèces de microalgues. Outre la quantité, la composition en TAG est également modifiée par la carence. Le stress azoté peut donc constituer un levier pour orienter les lipides de réserve vers une composition plus appropriée à une utilisation comme biocarburant.

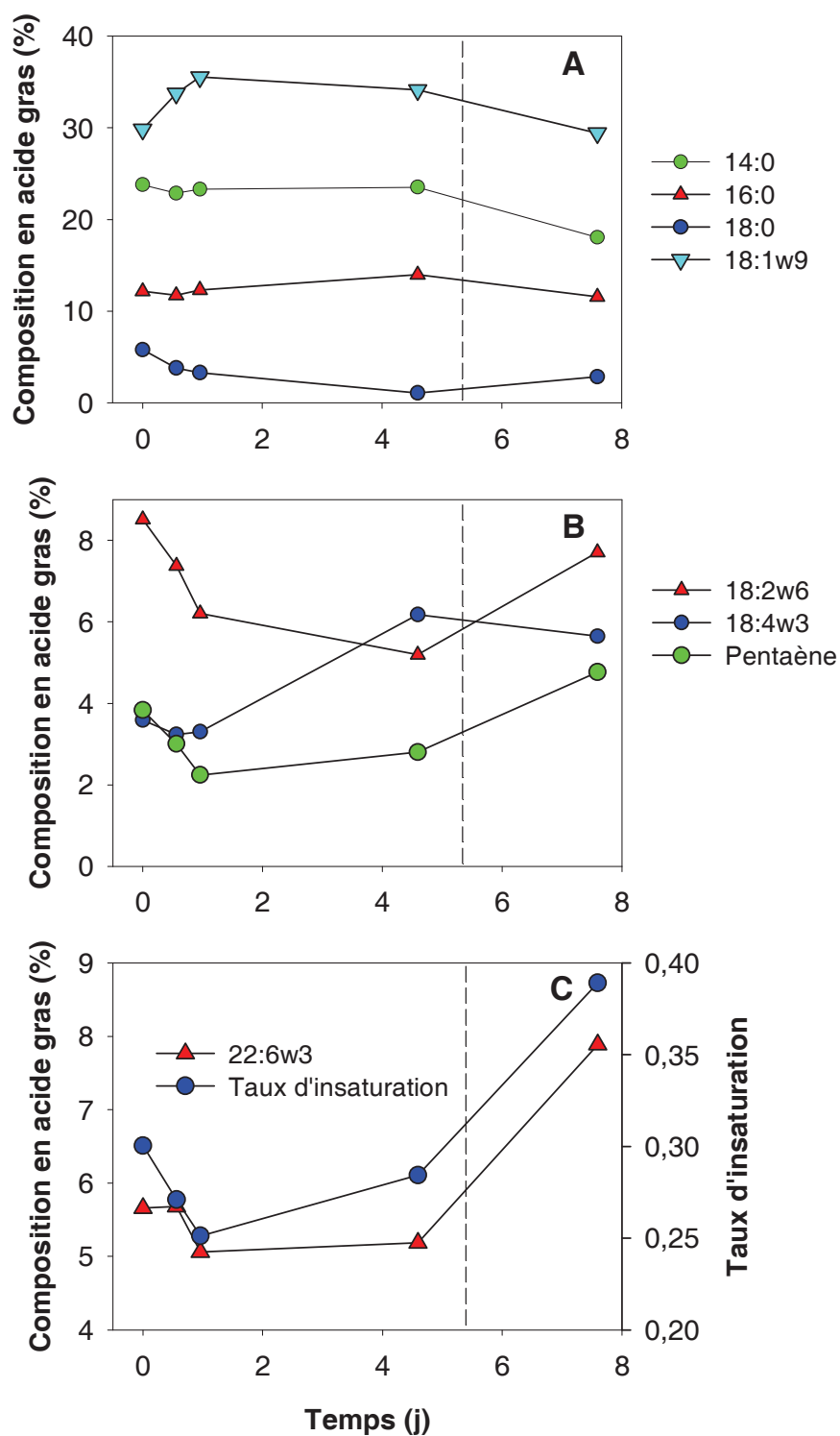


Figure 1: Variation de la composition des principaux acides gras et du taux d'insaturation des lipides neutres d'*Isochrysis* sp. au cours d'une carence en azote et après sa levée. La ligne pointillée marque la fin de la carence. A) 14:0, 16:0, 18:0, 18:1ω9 ; B) 18:2ω6, 18:4ω3, pentaène ; C) 22:6ω3 et taux d'insaturation (Polyinsaturés/(Saturé+Monoène)) des neutres. Le tableau des acides gras est fourni en Annexe 1.

L'influence d'une carence azotée sur la composition en acides gras des triglycérides d'*Isochrysis* sp. est faible (Figure 1). Pendant la carence, les proportions des acides gras saturés et des monoènes restent assez stables avec une légère diminution de l'acide stéarique (18:0) au profit de l'acide oléique (18:1 ω 9). On observe aussi une diminution de l'acide linoléique (18:2 ω 6), des pentaènes et du DHA (22:6 ω 3) et une augmentation de l'acide α -linoléique (18:3 ω 3) et de l'acide stéaridonique (18:4 ω 3). Le taux d'insaturation global des acides gras des TAG diminue au cours du premier jour de carence (-16%), lorsque des acides gras peu ou pas insaturés sont accumulés. Après 5 jours de carence, les acides gras des TAG récupèrent une partie de leur insaturation. Après la levée de carence, la tendance s'inverse, probablement en raison d'une consommation différentielle des acides gras : les AG polyinsaturés sont beaucoup moins consommés. On peut noter que c'est au cours des premiers jours de la carence qu'ont lieu les modifications les plus importantes, c'est à dire pendant la période où la majorité des TAG est accumulée.

La carence en azote provoque donc, pour *Isochrysis* sp. seulement des modifications marginales de la composition des TAG, notamment au travers d'une légère diminution de la longueur de chaîne et du degré d'insaturation des acides gras. L'indice de cétane, l'indice d'iode ou la viscosité des huiles ne sont que très faiblement modifiés par la carence (données non montrées). En conclusion, la carence en azote ne constitue pas, en tout cas pour *Isochrysis* sp., un levier significatif pour orienter la qualité des huiles.

Chapitre 5

V. Diel variations of carbohydrates and neutral lipids in N-sufficient and N-limited cyclostat cultures of *Isochrysis* sp.

Où il sera question :

- D'accumulation de lipides et de sucres en cycle Jour/Nuit
- De l'influence de la carence azotée sur l'accumulation de réserves dans des conditions d'éclairement photopériodique

Sommaire

1. INTRODUCTION	163
2. MATERIALS AND METHODS	165
3. RESULTS.....	171
3.1 N-sufficient phase	171
3.2 N starvation and recovery phases	175
4. DISCUSSION	180
4.1 N and C assimilations in a synchronized population	180
4.2 Lipid and TC metabolism in N sufficient growth under alternative light.....	182
4.3 Nighttime losses and the role of C reserves in alternative light	185
4.4 TC and neutral lipid metabolism in starvation under L/D cycle	186
5. CONCLUSION	187

Présentation du chapitre

Ce chapitre (article en préparation pour J. Phycol.) étudie l'influence des cycles lumineux diurnes sur la physiologie d'*Isochrysis* sp, notamment sur les métabolismes des réserves de lipides et de sucres.

Principaux résultats

Ce chapitre décrit les relations qui existent entre le cycle nycthéméral et l'accumulation de réserves énergétiques sous forme de lipides et de sucres. Les réserves sont accumulées pendant le jour en disproportion du reste du carbone et consommées pendant la nuit pour alimenter la division cellulaire et la croissance nocturne. La carence en azote dans ces conditions nycthémérales ne provoque pas d'accumulations significatives de lipides.

Diel variations of carbohydrates and neutral lipids in N-sufficient and N-limited cyclostat cultures of *Isochrysis* sp.

Thomas Lacour^{*1,2}, Antoine Sciandra^{1,2}, Amélie Gelay^{1,2}, Patrick Mayzaud^{1,2} Olivier Bernard³

1- Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

2- Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

3- Comore, INRIA, BP93, 06 902 Sophia-Antipolis cedex, France

* Tel: +33 4 93 76 38 10; Fax: +33 4 93 76 38 48; E-mail: lacour@obs-vlfr.fr

Abstract

We investigated the diel variations of Neutral lipid (NL) and total carbohydrate (TC) in the Haptophyceae *Isochrysis* sp. under circadian light cycle and in Nitrogen (N) sufficient and N-starved growth conditions. Our goal was to understand the respective roles of these carbon (C) reserves at different time scales (one hour to several days). Experiments were carried out in a cyclostat culture system under light/dark cycles that mimicked natural conditions at sea surface. This light regime led to the synchronization of the population with cells dividing mostly at the beginning of the dark period. The C-specific growth rate was maximal around midday and negative during the dark period, reflecting the consumption of C reserves by respiration during this period. NL and TC were both accumulated during the day and

consumed during the night. We showed that 77 % of the NL and 76 % of the TC accumulated during the light period were consumed during the dark period. We also analysed variations in time of phospholipids and glycolipids under alternating light and showed that their quota remained unchanged during the light/dark cycle. N starvation led to the end of the phasing between variation of C reserves quota and the photocycle. TC quota increased rapidly in response to N-starvation and remained high until the end of the starvation. However, under N-starvation, the variation of NL quota was sustained but with a different phase. We observed a negative linear relationship between TC and N quota.

Key index words: *Isochrysis*, carbohydrate, neutral lipid, phospholipids, glycolipids, light/dark cycle, nitrogen starvation, cell cycle

Abbreviations: C, Carbon; N, Nitrogen; NL, neutral lipid; NR, Nile red; TAG, triacylglycerol; TC, total carbohydrate; NO₃, nitrates; PFD, photon flux density.

1. Introduction

The main Carbon (C) and energy reserves of phytoplankton cells are carbohydrates and triacylglycerols that can be oxidized to provide energy (ATP), reducing power (NADPH) and C for *de novo* molecules synthesis. These reserves allow cells to survive in variable growing conditions, as environmental changes modify both their requirement and availability of energy. Carbohydrates and triacylglycerol serve as buffers by providing energy (consumption) or by channeling excess energy (accumulation) in case of low or high irradiances, respectively.

Under light/dark regime, cells grow by using the energy accumulated during the light period, as photosynthetic activity is by definition restricted to this period. Consequently, most of the components of photosynthetic organisms are synthesized and accumulated by the cells during the light period (Shifrin and Chisholm 1981, Sukenik and Carmeli 1990, Fábregas *et al.* 2002). However, important metabolic processes are maintained during the night. Under optimal growing conditions, most phytoplanktonic species have been shown to divide during the dark phase of the photocycle, during which synthesis of different compounds must occur, including proteins. Also, many species have been shown to be able to assimilate NO_3 in the dark (Clark *et al.* 2002) particularly during N-limitation (Smith *et al.* 1992). Consequently, phytoplankton cells which encounter regular photoperiod have to store sufficient C and energy during the light phase of the photocycle to support such dark processes (Cuhel *et al.* 1984).

Another environmental constraint that leads to reserve accumulation is N limitation. The effect of N limitation on C storage into carbohydrates and lipids has been described as a way to channel C and energy in excess when growth becomes nutrient-limited (Spoehr and Milner 1949, Opute 1974, Shifrin and Chisholm 1981). Conversely, Lacour *et al.* (submitted a) have

also shown that C reserves are consumed substantially (through oxidative pathways) after N recovery to support growth requirements. C reserves are thus also implicated in microalga response to N limitation.

Most studies performed on the effect of N limitation on C reserve dynamics were done under continuous light regime. The goal of this study is to understand further the role played by C reserves in phytoplanktonic cells both growing under L/D cycles and adapting to N-limitation. Using cyclostat cultures of *Isochrysis* sp., we compare the dynamics of neutral lipids (principally composed of triacylglycerols) and total carbohydrates (TC) during diel light cycles in N-sufficient and N-limited conditions.

2. Materials and Methods

Culturing system. We used unialgal culture of *Isochrysis* sp. (clone T-iso, called Tahitian *Isochrysis*, CCAP 927/14). The culture vessels consisted of 5L water-jacketed cylinders connected to a circulating water bath allowing maintaining a constant temperature of $22\pm0.1^{\circ}\text{C}$. The medium was prepared in several 20L tanks (Nalgene) filled with $0.22\ \mu\text{m}$ Millipore-filtered natural seawater and autoclaved at 110°C for 30 min. After cooling, sterile addition of nutrients was made according to the f/2 formulation (Guillard 1975), omitting nitrate (NO_3), the limiting nutrient, which was added separately in the tanks. The renewing medium was added to the culture vessels through a $0.22\ \mu\text{m}$ sterile filter (SpiralCap, Gelman) by peristaltic pumps (Gilson). Light/dark illumination (12:12h) was provided by two arrays of six 50 cm U-shaped, dimmable fluorescent tubes (Osram, Dulux®, 2G11, 55W/12-950, lumilux de luxe, daylight) placed on each side of culture containers. The light spectrum and the photon flux density (PFD) controlling device are given in Bruyant et al. (2001). PFD was measured by a 2 Π spherical collector (QSL-100, Biospherical Instruments) immersed in the centre of the culture vessels. Cultures were subjected to continuous gentle stirring and air bubbling to insure homogeneity.

Two similar experiments were carried out with continuous cultures. Experiment 1 (Exp 1), performed in duplicate chemostats (C1 and C2), was designed to measure the NL content of *Isochrysis* sp. grown under light/dark cycles in successively N-sufficient and N-starved conditions. In Experiment 2 (Exp 2), the diel variation of different lipid classes was measured in N-sufficient conditions over one light/dark cycle only. Exp 2 was performed separately from Exp1 because the biochemical lipid class analysis requires large sample volume that could not be supported by the culture renewing rate in Exp 1.

PFD at noon in Exp 1 was $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and pH was maintained at 8.0 by automatically controlled injection of CO_2 (for detail see Sciandra et al. (2003)). NO_3 concentration in the renewal medium was $300 \mu\text{M}$. Cell densities in the duplicate cultures were first let to increase by setting the dilution rate D equal to zero, and then stabilized by adjusting D to the daily averaged growth rate measured during the batch phase ($D=1.0 \text{ d}^{-1}$). The stabilized algal concentration was such that the residual NO_3 in the cultures was not growth limiting (i.e. $> 30 \mu\text{M}$). The condition of N-starvation was obtained by replacing the renewal medium by a medium without NO_3 . After 4 days of starvation, NO_3 was added in both the culture vessel and the renewal medium to rapidly replenish cells with N and to maintain N-sufficient growth conditions. NL was measured every 2 hours by the Nile Red fluorescence technique (see below). Culturing conditions in Exp 2 were as in Exp 1, excepted that the partial pressure of CO_2 was not controlled and that light intensity at noon was $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cell density and NO_3 . High frequency monitoring of the chemostat cultures was performed throughout the experiments to obtain information on the main variables of the cultures. Cell density and size distribution were automatically measured every 2 hours with an optical Hiac counter (Pacific Scientific). This information was essential to survey the culture evolution and to check in real time that the level of biomass was stabilized. Multisizer 3 Coulter counter (Beckman), which gives more accurate estimation of the mean diameter than the Hiac does, was used during the periods of intensive sampling presented in this study. NO_3 and nitrite (NO_2) concentrations were also measured on-line every 2 hours with a Technicon Auto-analyzer coupled to an automated data-acquisition system (Malara and Sciandra 1991). This system allowed ascertaining that cultures were not N-limited.

Cellular, elemental and biochemical analyses. Particulate C and N were determined every day on triplicate samples. 10 mL of culture were filtered onto glass-fiber filters (Whatman

GF/C) precombusted at 500°C for 12 hours. After filtration, samples were kept at 60°C before elemental analysis with a CHN analyzer (Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O). TC and chlorophyll *a* were determined in duplicate or triplicate samples of 5 mL of culture filtered onto precombusted glass-fiber filters (Whatman GF/C). TC were analyzed by the phenol method (Dubois et al. 1956). Chlorophyll *a* was determined after extraction in a 2:3 mixture of dimethyl sulfoxide and 90% acetone (DMSO/acetone) using a Turner fluorometer (Model 10-AU-005-CE) (Shoaf and Lium 1976, Welschmeyer 1994).

Nile red fluorescence was measured uniquely in Exp 1 using a fluorescence spectrophotometer Cary Eclipse (Varian). Nile red fluorescence at 580 nm (520/580, Ex/Em) is known to be proportional to the NL concentration in the sample (Cooksey *et al.* 1987). This method was previously validated ($R^2=0.93$) by a series of test analyses (n=36) performed in various conditions of N limitation (Figure 1). In the following, Nile red fluorescence measurements are called “NR lipids”.

Biochemical measurements of lipid classes were done uniquely in Exp 2. Total lipids were first quantitatively extracted using the method of Bligh and Dyer (1959). After 2 initial extractions of the tissue with a monophasic mixture of chloroform: methanol: water (1: 2: 0.8, v: v: v), chloroform and water were added to the extract for phase separation. Lipids were present in the chloroform phase which was evaporated. All lipid extracts were stored at –80 °C until analysis. To avoid lipid auto-oxidation, an N atmosphere was maintained all the time. Separation of neutral and polar (glycolipids and phospholipids) lipids was achieved on a preparative scale by column chromatography on silica gel (Extract-Clean, Alltech). The NL fraction was eluted with six column volumes of chloroform. Glycolipid fraction was eluted with 4 column volumes of acetone and phospholipid fraction with 5 volumes of methanol and 2 volumes of methanol/ammonia (90:10). All the fractions were evaporated and weighted.

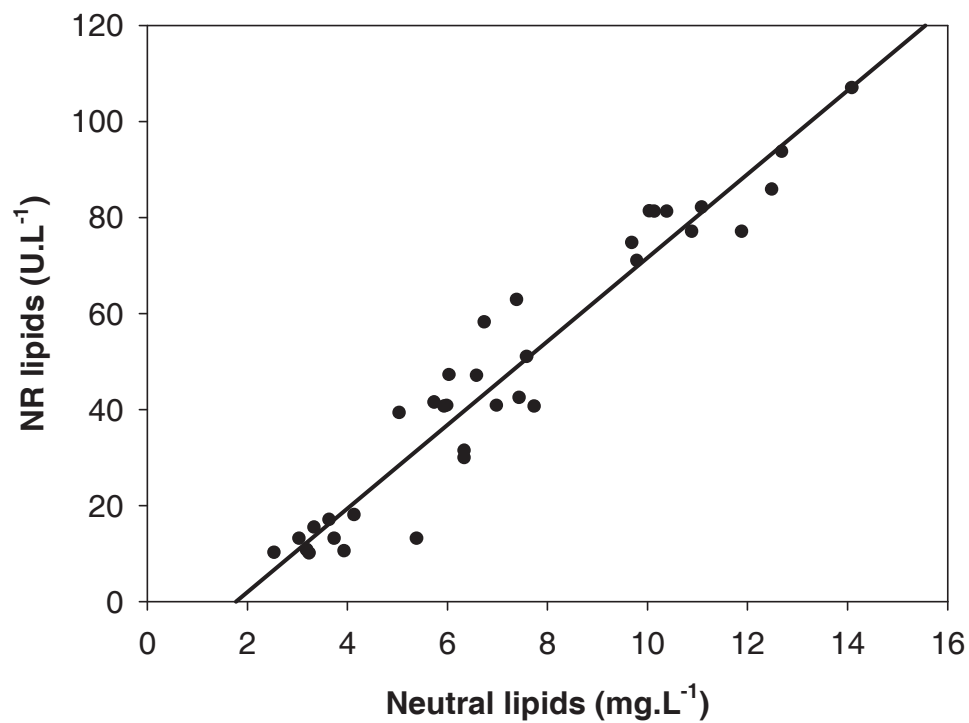


Figure 1: Relationship obtained in a preliminary study between Nile red fluorescence (520/580, Ex/Em; U) and neutral lipid concentration extracted from cultures in various conditions (N-sufficient, N-limitation and N-starvation growth).

Growth rates. The population growth can be estimated from either the C or the cell density variation rates. In a continuous culture, equation (1) represents the net specific rate of C assimilation (μ_c), and (2) the cell division rate (μ_{cell}) at a given dilution rate D:

$$\mu_c = \frac{1}{C_c} \cdot \frac{dC_c}{dt} + D \quad (d^{-1}) \quad (1)$$

$$\mu_{cell} = \frac{1}{C_{cell}} \cdot \frac{dC_{cell}}{dt} + D \quad (d^{-1}) \quad (2)$$

These rates can be estimated from two discrete data measurements obtained on the time interval $\Delta t = t_2 - t_1$:

$$\mu_i = \frac{\ln\left(\frac{C_i(t_2)}{C_i(t_1)}\right)}{t_2 - t_1} + D \quad (d^{-1}) \quad (3)$$

C-normalized production rate. The following equation represents the specific production rate of a component i having a bulk concentration C_i in the culture:

$$P_i = \frac{\frac{dC_i}{dt} + D \times C_i}{C_c} \quad (mg.mgC^{-1}.d^{-1}) \quad (4)$$

In the following, P_N , P_{Chla} , P_{TC} and P_{NR} are the C-normalized production rates of N, Chl a , TC and NR lipids, respectively. Note that when the index i refers to C (total Carbon), the C-normalized production rate P_C reduces to the C-specific growth rate μ_c ; in other words, $P_C = \mu_c$.

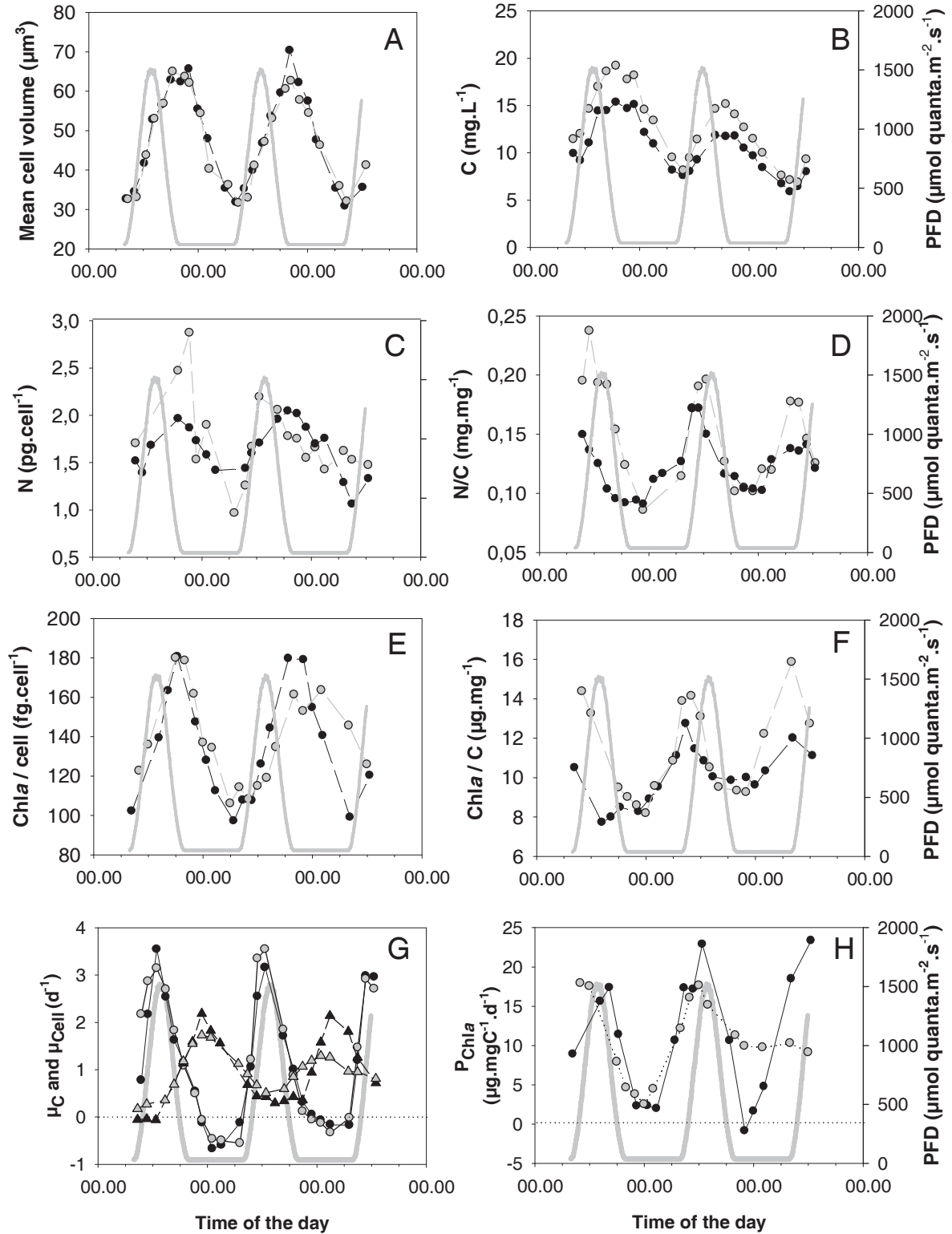


Figure 2: Variation in mean cell volume (A), particulate C concentration (B), N per cell (C), N/C ratio (D), Chla per cell (E) or per C (F), cell division rate (triangles) and C-specific growth rate (circles) (G) and C-normalized production rates for Chlorophyll (Chla) (H) under light/dark cycle with N-sufficient growth in Experiment 1 for chemostat 1 (black circles) or chemostat 2 (grey circles).

3. Results

In the following, most the results presented were obtained from Exp 1, except the lipid class composition data that were measured within Exp 2.

3.1 *N-sufficient phase*

The diel variations of the mean cell volume (Figure 2A) resulted from C fixation during the day, and C consumption by respiration and cell division during the night (Figure 2G). Despite the large variation in the instantaneous C-specific growth rate induced by the light/dark cycles (ranging from -0.5 to 3.5 d^{-1} , Figure 2G), its daily-averaged rate was sustained at about 1.0 d^{-1} . The maximum rate of C fixation occurred just before midday, and 26 % of the C accumulated during the day was consumed during the night.

The 2 duplicate cultures showed very similar daily-averaged cell division rates of $1.00 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ corresponding to 1.43 divisions per day. Division rate was not uniform during the light/dark cycle (Figure 2G) as the cell population was synchronized by the light signal. The maximum division rate occurred between 22:00 and 02:00. As the division rate was never null, it can be deduced that the population was only partially synchronised. Analysis of the diurnal division rate shows that 80 to 90 % of the divisions occurred during the dark period in culture 1 (C1). The same evolution could be observed in culture 2 (C2) although, for an unknown reason, synchronization was less pronounced during the second day where only 70 % of the division occurred at night. These observations suggest that the majority of the cells divided during the dark phase, and that a smaller proportion of the cell population was also able to divide once again during the light phase.

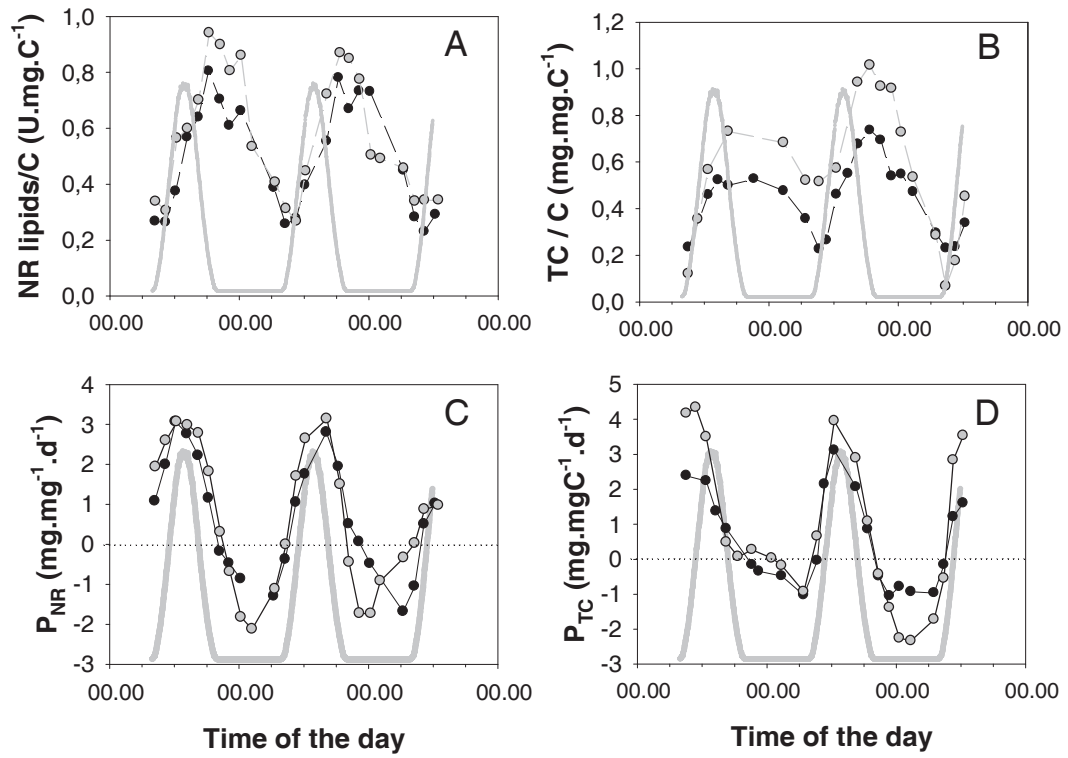


Figure 3: Variation in C-normalized Nile red fluorescence (Nile red lipids) (A), or total carbohydrate (TC) (B), C-normalized NR lipid production rate (P_{lip}) (C) and C-normalized TC production rate (P_{car}) (D) under light/dark cycle in N-sufficient growth in Experiment 1 for chemostat 1 (black) or chemostat 2 (grey).

Cellular N increased from the end of the night to the middle of the afternoon (Figure 2C) with a maximum assimilation rate in the morning (see Figure 5C, day 1). Although N was assimilated during the day, the N to C ratio decreased during the light period because C was accumulated faster than N during this period (Figure 2C, 2D). During the night, the N/C ratio increased due to C consumption. In the same way, Chla to C ratio decreased during the light period (Figure 2F) because Chla production was slower than C assimilation. Chla to C ratio increased during the dark period. Chla per cell presented opposite patterns as it increased and decreased during the light and dark periods, respectively (Figure 2E). C-normalized production rate of Chla presented a maximum value at midday and was very low in the dark (Figure 2H). Chla to N ratio remained quite constant during the diel cycles (Figure 2CD vs. 2EF).

NR lipids and C presented different dynamics as NR lipids to C ratio increased during the light, reached a maximum value at the end of the light period and decreased during the night (Figure 3A). Figure 3C shows that neutral lipid were accumulated during the light and actively consumed during the dark. During the N-sufficient growth period, 77 % of the NL accumulated during the light was consumed during the dark period.

Whereas the cell contents of NL, glycolipids and phospholipids showed similar patterns of variation under light/dark illumination (Figure 4A), the ratios of these compounds to C showed different time changes under alternating light (Figure 4B). NL to C ratio increased during the light and decreased during the dark while phospholipids and glycolipids to C ratios remained unchanged.

TC presented the same dynamics as NL under alternating light. 76 % of the TC accumulated during the light period was consumed during the following dark period (Figure 3D). Consequently, TC per cell and TC to C ratio increased during the day and decreased during the night (Figure 3B).

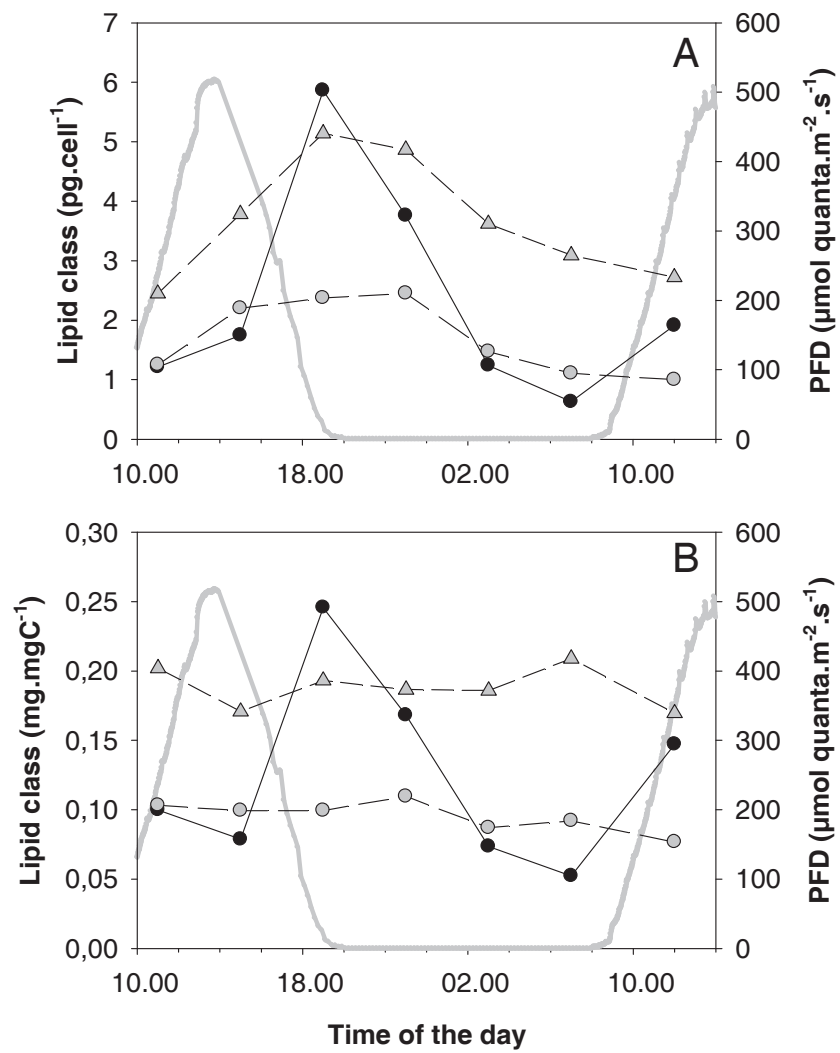


Figure 4: Neutral lipids (black circles), glycolipids (grey circles) and phospholipids (grey triangles) variation during light/dark cycles normalized by cell number (A) and total C (B) in Experiment 2.

3.2 N starvation and recovery phases

As expected, NO₃ removal rapidly led to an arrest of N assimilation (Figure 5C). The diurnal variation of C fixation was still visible after one day of NO₃ starvation, but with smaller amplitude than before, and fixation rate was close to zero after two days (Figure 5B). NO₃ removal led to a large decrease in Chl*a* to C ratio (Figure 6B) reflecting the downregulation of photosynthetic processes. During the time elapsed between the decrease of N assimilation and the decrease of C fixation, N pool was consumed, leading to N/C ratio decrease to reach a stable low level (Figure 6A). Diel variations of cell division continued only until the first dark period following the onset of NO₃ starvation (Figure 5A), after what the division rate remained very low. The arrest of the division was accompanied by a progressive increase of the mean cell volume (Figure 7A) which reached, on day 5.3, values similar to the highest values measured at the end of the light periods during the N-sufficient phase. Thereafter, the mean cell volume decreased slightly before N resupply. Diel variations of cell NR lipid were also affected by NO₃ starvation (Figure 7B) as oscillations stopped one day after the onset of NO₃ depletion, after what NR lipid increased until day 5.3. The re-consumption of NR lipid clearly observed later in the two cultures parallels the decrease of the mean cell volume. N starvation also led to an increase of cell TC (Figure 7C). TC to C ratio (data not shown) was increased by 80 % during the first day of starvation. Note that TC accumulated during the first light period after the onset of NO₃ depletion were, by contrast with NR lipids, only slightly re-consumed during the following dark period.

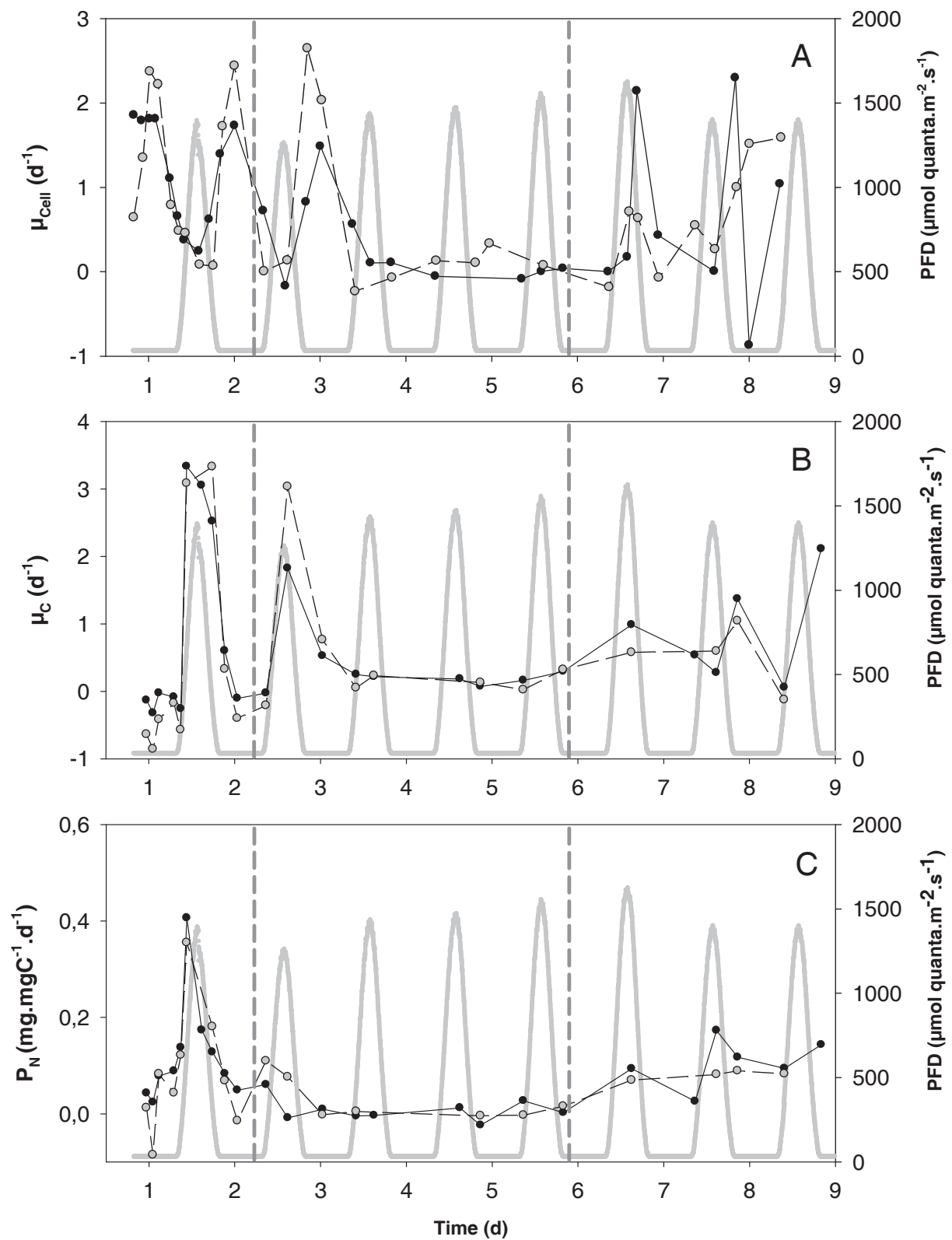


Figure 5: Variations in cell division rate (A), C-specific growth rate (B) and C-normalized N production rate (P_{N}) (C) under light/dark illumination in chemostat 1 (black circles) and chemostat 2 (grey circles). Dashed lines represent the beginning and the end of the NO_3 starvation period.

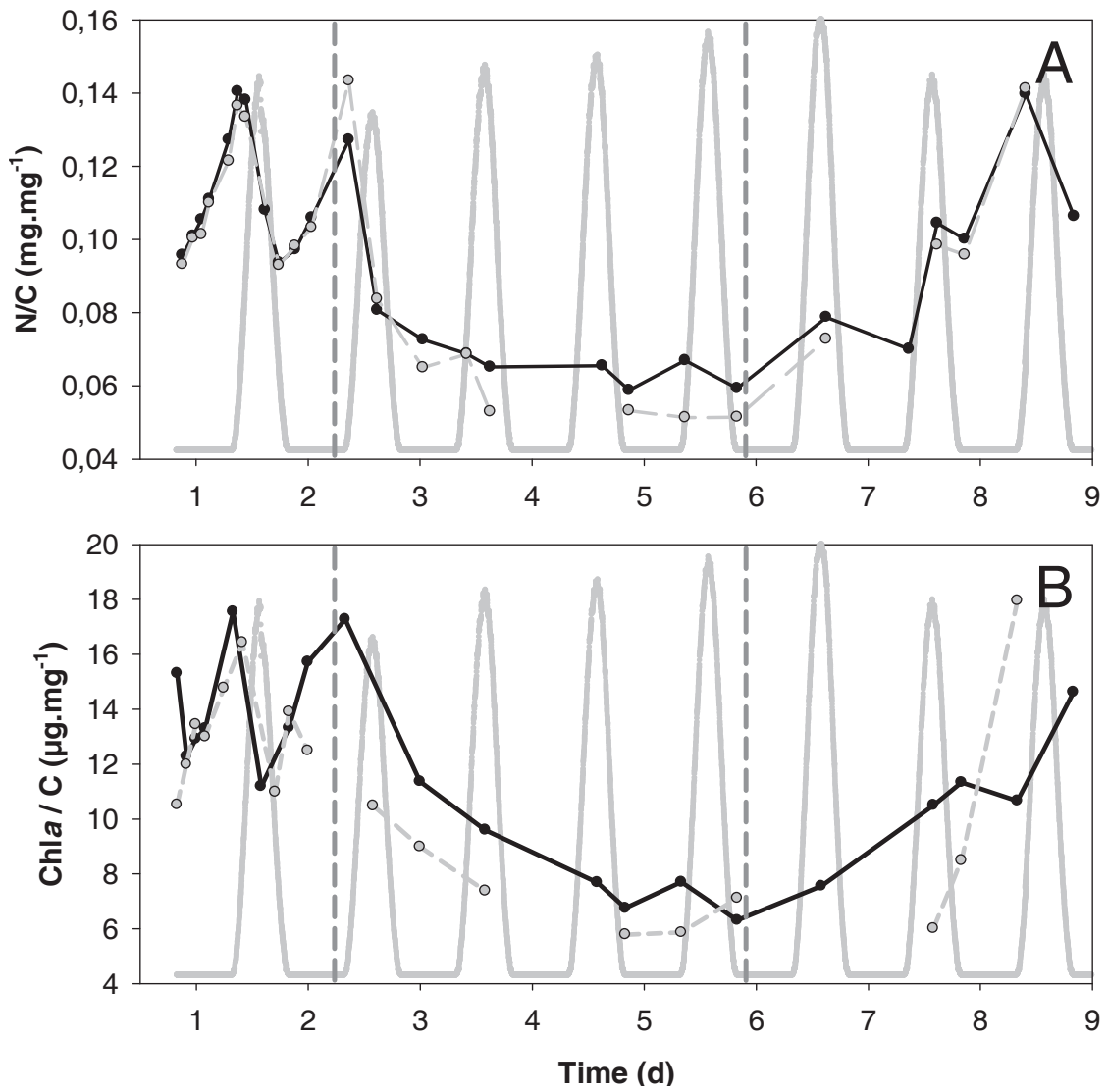


Figure 6: Variation in N/C ratio (A) and chl a to C ratio (B) under light/dark illumination in chemostat 1 (black circles) and chemostat 2 (grey circles). Dashed lines represent the beginning and the end of the NO_3 starvation period.

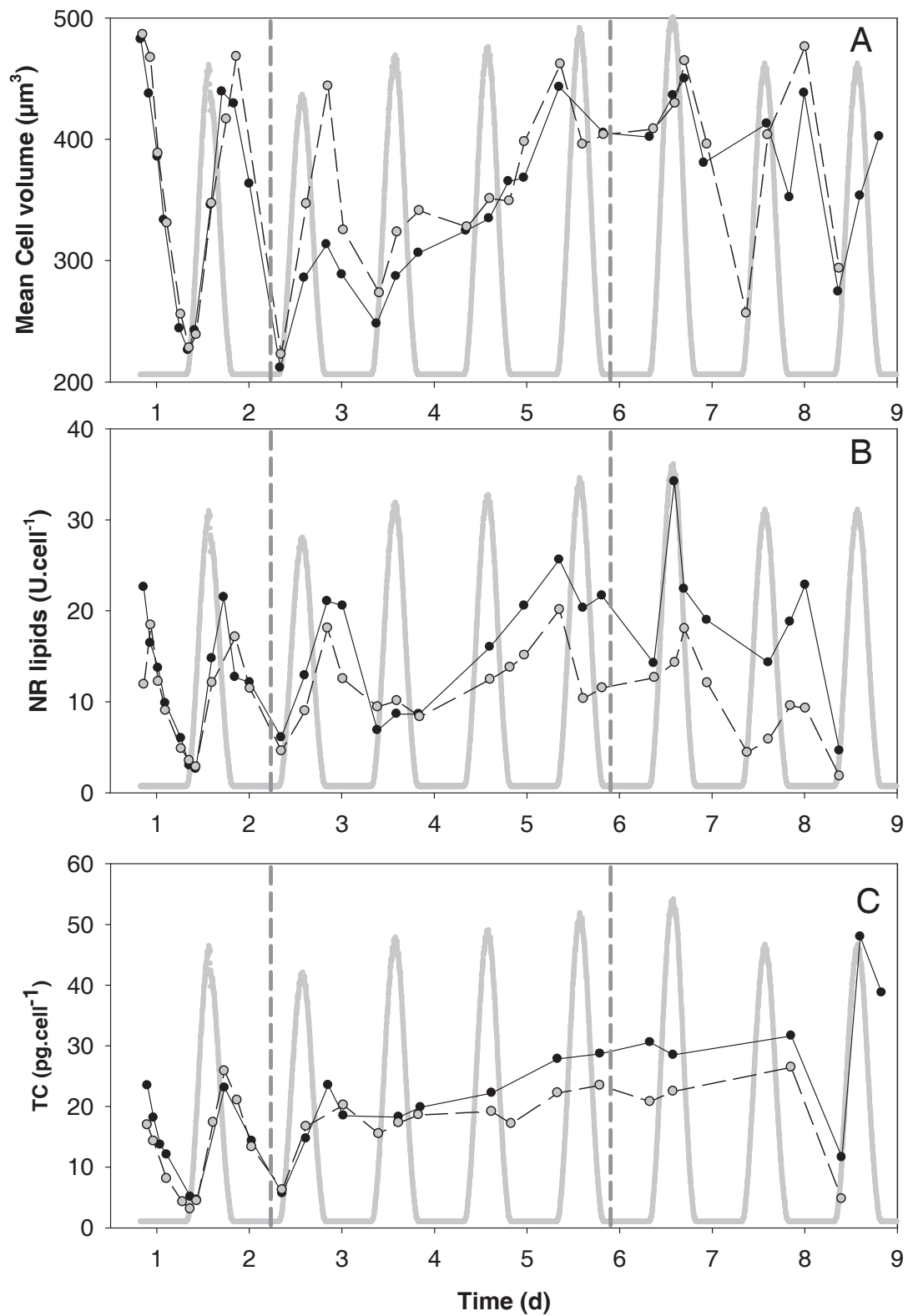


Figure 7: Variations in mean cell volume (A), NR lipid per cell (B), and TC per cell (C) under light/dark illumination in chemostat 1 (black circles) and chemostat 2 (grey circles). Dashed lines represent the beginning and the end of the NO_3 starvation period.

NO₃ replenishment allowed the cells to recover their original growing potential, as during the following days N/C and Chl *a*/C ratios increased progressively to reach their respective N-sufficient values. During the light phase following the NO₃ resupply, mean cell volume (Figure 7A), cell content of NR lipids (Figure 7B) and division rate (Figure 5A) were enhanced. Thereafter, the mean cell volume retrieved its original pattern of diel variation, whereas the signal of division remained chaotic, suggesting that, during this phase of recovery, the cell size variation was more driven by the photoperiodic exchange of C than by the division process. After NO₃ addition, cell NR lipids rapidly retrieved the pattern of diurnal oscillations originally observed in N-sufficient conditions.

4. Discussion

4.1 N and C assimilations in a synchronized population

The effect of L/D cycle on the cell cycle of many algal species leads to their synchronization (Chisholm and Costello 1980, Prezelin 1992). The mechanism by which L/D cycle acts as a *zeitgeber* is not totally understood. Some studies make reference to an endogenous oscillator (the circadian clock) controlled by light (or other external signal as nutrient availability, temperature...) and that synchronizes cell division by restricting mitosis to a specific phase of the photocycle. Light has also been shown to control cell cycle by providing the energy required for cell division but also as a signal for cell cycle progression (Claquin *et al.* 2002, Hagiwara *et al.* 2002, Kromkamp and Claquin 2006).

In our study, N-sufficient cultures of *Isochrysis* sp. were relatively well synchronized by the photocycle, as already reported for *Isochrysis galbana* (Nelson and Brand 1979, Flynn *et al.* 1992) or for many other species (Nelson and Brand 1979, Prezelin 1992). The rate of division reached its higher and lower values around midnight and noon, respectively (Figure 2G), suggesting that the majority of the population divided in the middle of the dark phase. Synchronization was not total and a part of the population was able to divide a second time during the day (ultradian mode), according the observations that, during this phase, the division rate was not null, and that 1.4 divisions occurred each day in average in the population. Phenotypic variability of cells, notably concerning their ability to achieve their life cycle in a given time interval under specific growing conditions is the primary source of unsynchronization. Synchronization is an important issue, as it confers to the population particular properties inherent to the fact that some metabolic processes are related to the position of the cell in its life cycle.

Concerning the fixation of Carbon, it is not easy to discern the influence of the cell cycle on the photosynthetic activity, because photoperiod controls simultaneously the photosynthesis and the cell cycle, and *de facto*, under L/D regime, photosynthesis is always cyclic even in an unsynchronized population. In this study we demonstrate a positive relationship between C assimilation and light intensity during L/D cycles leading to a maximum C-specific growth rate at midday (Figure 2G). It has been shown that photosynthetic capacity presents diel periodicity with a maximum in the morning or at midday (Harding *et al.* 1983), but it remains unclear whether changes are regulated by the photocycle (Gerath and Chisholm 1989) or by the cell cycle stage (Claquin *et al.* 2004). Claquin *et al.* (2004) have demonstrated that *Cylindrotheca fusiformis* cells in G1, just after division, detain the highest maximal photosynthetic capacity.

Concerning N assimilation, our experiment shows that the higher rates were measured during the light phase (Figure 5C). In N-sufficient conditions, the strong coupling between PFD and N acquisition can be explained by N assimilation requirements in energy, reducing power and C skeletons that are provided by the light-dependent processes of photosynthesis. But some species, notably diatoms, have been shown to be able of dark N assimilation (Clark *et al.* 2002), shifting their nocturnal requirements from photosynthetates to energy reserves. Our results show that N acquisition was very low during the night in spite of the large available energy reserves accumulated during the day (see below), and suggest that dark N acquisition was not only reduced due to the reduction of PFD, but also, and maybe primarily, by the occurrence of mitosis and cell division during which nutrient acquisition are probably not possible.

Depending on species, N starvation is known to arrest cell cycle in stage G1 (Olson *et al.* 1986, Hildebrand and Dalhin 2000) or G2 (Claquin *et al.* 2002). After the NO₃ depletion operated in our experiment, the mean cell volume augmentation (Figure 7A) observed during

the time where no division occurred (Figure 5A) suggests that the proportion of cell arriving and resting in G1 or G2 stage increased progressively during this period, leading the population to its maximum level of synchronization at the end of the starvation phase. This particular situation explains why the addition of NO₃ was so rapidly followed by a huge increase of the division rate, at least in the C1 culture.

4.2 Lipid and TC metabolism in N-sufficient growth under alternative light

Most of the studies carried out on lipid acclimation to environmental changes have measured the total lipid content, although lipids comprise a large number of classes involved in different cellular functions: fuel, signalling molecules, and components of biological membranes (plasma and organelles membranes). Our results emphasize the importance of measuring separately these classes because they display different behaviours at the diel scale and because they are differently influenced by environmental conditions in function of their cellular role. For example, NL to C ratio was shown to increase during the day to provide energy and C to the cell at night, while the C-normalized phospholipids and glycolipids fractions remained constant. Glycolipids and phospholipids variation was only associated to cell growth and division.

Reserve components are synthesized during the light period and so are accumulated by the cells that divide during the dark. Shifrin and Chisholm (1981) insisted on the importance of normalization when studying synchronized culture studies. They demonstrated that *Oocystis polymorpha* synthesized lipid during the light but at the same rates as the rest of the C suggesting that the observed lipid cell variations were directly associated with cell growth and division. Sukenick and Carmeli (1990) and Fabregas et al. (2002) demonstrated that *Nannochloropsis* sp. synthesized neutral lipids, TC and proteins during the light period but

the TC fraction (normalized by organic fraction or C) remained stable ; concurrently, the lipid and protein fractions varied in an inverse mode during the L/D cycle with lipid fraction increasing during the day and decreasing during the night. In our culture conditions, *Isochrysis* sp. neutral lipids and TC had similar variations in response to alternating light; accumulated during the day and consumed during the night (Figure 3 and first day in Figures 7B and 7C).

The observed increases in fatty acid and TC syntheses during the light period is in agreement with other studies which demonstrated that some key enzymes of fatty acid and TC synthesis pathway are regulated by light. Acetyl-CoA Carboxylase catalyses the first committed step of fatty acid synthesis and its activity is indirectly controlled by light (Sasaki and Nagano 2004). The enzyme activities of the reductive pentose phosphate pathway are also regulated via a redox cascade generated by light. During the light period, photosynthesis provides energy in excess (ATP, C skeleton, reductive power) that stimulates the activity of these enzymes and C reserves are accumulated by cells.

An additional way to explain the accumulation of C reserves during the light period under high light intensity was proposed by Clark et al. (2002). They proposed that C accumulation was the result of an imbalance between N and C metabolism. In this study we showed that N/C ratio decreased during the light period because the rate of NO₃ assimilation could not match that for C-fixation (first day of Figures 7B and 7C), suggesting that NO₃ assimilation can limit growth even when NO₃ is available in the culture medium. Excess C and energy provided by photosynthesis are thus channelled into N-free products (TC and lipids). Indeed, the negative linear relationship between TC and N/C ratio independent of N availability in the culture medium (Figure 8) is in agreement with this hypothesis. The same applies to NL and N/C ratio (not presented). During the night, fatty acid and TC synthesis pathways are downregulated and catabolic processes are activated.

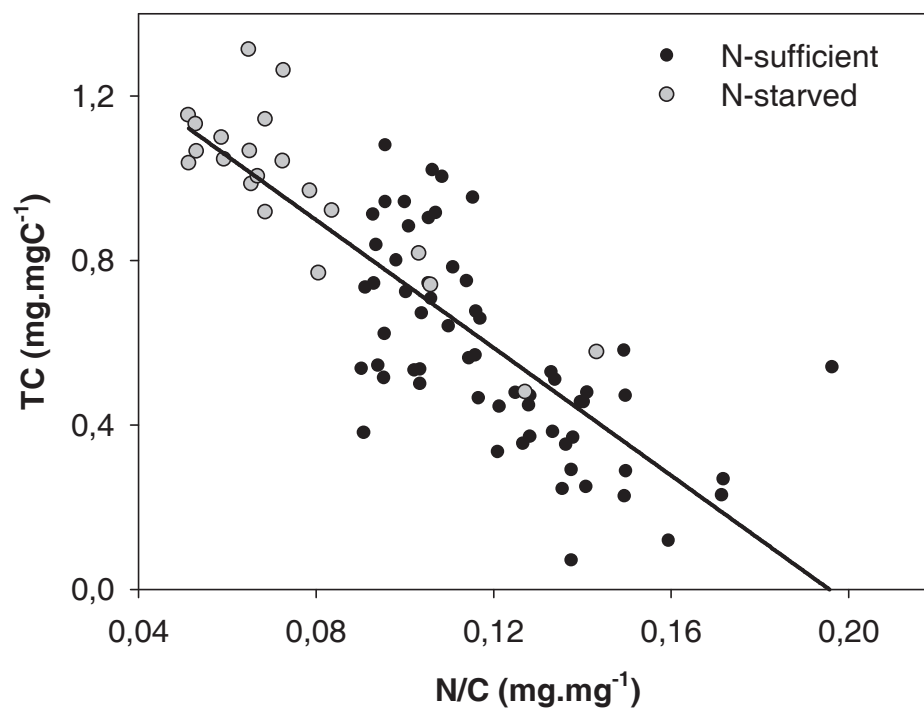


Figure 8: Relationship between TC and N/C ratio under L/D cycles in N-starvation (grey circles) and in non-limited growth (dark circles). Linear regression is fitted on all samples.

4.3 Nighttime losses and the role of C reserves in alternative light

We demonstrated that nighttime C losses averaged 27 % of the previous 12 h uptake (Figure 2B) which is in agreement with the 20-25% observed in previous studies (Marra and Barber 2004). Grobbelaar and Soeder (1985) estimated the overall loss during 12h of darkness to be 2–10% of the biomass prior to darkening and expected higher losses at stronger irradiances. These losses can be attributed to catabolic processes. Handa (1969) demonstrated that glucose and its oligosaccharides and 1,3-glucan are substantially and rapidly consumed by *Skeletonema costatum* placed in the dark. He demonstrated that lipids were also catabolized but after a lag time and more slowly. Dark respiration is generally attributed to TC catabolism (Cuhel *et al.* 1984, Geider and Osborne 1989). Cuhel *et al.* (1984) showed that TC and metabolic pools were principally consumed during the night. We demonstrated in this study that both TC and neutral lipids are used in the same phase and relative amplitude during the dark and are probably largely responsible for the observed C loss.

Oxidative processes like respiration occur all around the L/D cycle. Geider and Osborne (1989) showed that the ratio between respiration rate (in the dark) and growth rate varies both with the taxon under consideration and with environmental conditions. Dark respiration plays two essential roles in microalgae. In the dark, respiration is the exclusive source of energy for maintenance and biosynthesis of new compounds. At all times respiration provide essential C skeletons for biosynthesis. We showed that TC and lipids net biosyntheses stopped upon entering the dark period, but other component may be synthesized in the dark. In a previous unpublished work on L/D cycle we demonstrated that *Isochrysis* sp. synthesizes proteins in the dark. Proteins have been shown to be synthesized in the dark at the expense of TC and low molecular weight compounds for different species (Foy and Smith 1980, Cuhel *et al.* 1984). These observations suggest that a part of the energy provided by neutral lipid and TC consumption is used for night synthesis of protein.

4.4 TC and neutral lipid metabolism in starvation under L/D cycle

Many studies showed that NO_3 starvation lead to an accumulation of neutral lipids (Spoehr and Milner 1949, Livne and Sukenik 1992) and TC (Harrison *et al.* 1990, Fábregas *et al.* 1995) under continuous light. The accumulation of C reserves is generally interpreted as a way to channel energy when growth becomes limited by nutrients. Only few studies were interested in starvation under alternating light. Flynn *et al.* (1992) demonstrated that under diel cycle *Isochrysis* sp. did not accumulate lipids during NO_3 starvation ,displaying alternating accumulation and consumption periods not directly linked to light and dark period (consumption was observed in the light). This is consistent with the present work. Neutral lipids re-consumption during starvation was not associated with dark period or increase in TC content. The first decrease in neutral lipid content during the first night of N-starvation (Figure 7B) can be associated with the cell cycle (size and division) and eventually protein synthesis.

The second re-consumption at day 4 of starvation is not associated with any identified physiological process (division, NO_3 absorption and assimilation). Interestingly, in both N-sufficient and N-limited growth, neutral lipid re-consumption occurs when neutral lipid cell content reach the same maximum value (20-23 U fluorescence.cell⁻¹) that is independent of the time of the day during N-starved growth, suggesting there might be an upper limit to either the lipid storage capacity (lipid bodies) or to the cell volume that concomitantly reached its maximum in both cases.

In this study we showed that NO_3 starvation had a different effect on TC accumulations. Normal TC accumulation occurred the first day of starvation but with only a small decrease during the following nights. NO_3 starvation led to accumulation of TC probably through a decrease in TC consumption. This is consistent with the work of Geider and Osborne (1989) that showed an important decrease in respiration rate under NO_3 starvation and in general a

positive relationship between growth rate and respiration rate. They proposed that under NO_3 starvation, respiration rate is limited indirectly by inorganic N through the low demand of C skeletons.

5. Conclusion

NO_3 starvation has been presented as a way to enhance lipid productivity for oil production. A previous work (Lacour *et al.*, submitted a) on *Isochrysis* sp. under continuous illumination in the same physico-chemical conditions demonstrated an accumulation of neutral lipids during NO_3 starvation. The contradictory results obtained with diel cycle demonstrate the critical role played by photoperiod. This study underlined the differences in carbohydrate and lipid metabolic response to NO_3 starvation demonstrating their different physiological role in the cell. This study also provides information on the dynamics of Carbon assimilation and transformation under high light intensity under various degrees of Nitrogen limitation that can help understanding Carbon flux in the ocean.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Shamash project (ANR-06-BIOE-014), the Conseil Général des Alpes-Maritimes, and by the EDD department of CNRS. The authors gratefully acknowledge C. Meunier for his important help during sampling.

Chapitre 6

VI. Response of *Isochrysis* sp. glycolipids and constitutive fatty acids to Nitrogen limitation and Light/Dark cycle

Sommaire

PRESENTATION DU CHAPITRE	193
1. INTRODUCTION	196
2. MATERIAL AND METHODS	198
3. RESULTS.....	203
3.1 L/D cycle, Experiment 1	203
3.1.1 Physiology: cell growth and division	203
3.1.2 Glycolipid composition	205
3.2 Nitrate limitation: Experiment 2	211
3.2.1 Physiology :	211
3.2.2 Glycolipid composition	211
3.2.3 Photosynthetic proteins composition and efficiency parameters.....	213
4. DISCUSSION	214

Présentation du chapitre

Ce chapitre correspond à un article soumis à la revue J. Phycol., et traite de l'influence de la limitation azotée et de la photopériode sur la composition des glycolipides des chloroplastes.

Principaux résultats

Ce chapitre montre que les changements des teneurs de certaines classes de glycolipide (MGDG, DGDG, SQDG) et du degré d'insaturation de leurs acides gras accompagnent les modifications d'activité photosynthétique des cellules soumises à une limitation azotée et en cycle Jour/Nuit. Nous avons pu, pour ces conditions de croissance, comparer la composition lipidique des membranes des thylakoïdes avec des paramètres de la croissance mesurés dans cette étude (taux de croissance, taux de division, composition de la biomasse) et avec des paramètres de la photosynthèse ($1/\tau$, P_{\max} , abondance des protéines photosynthétiques) obtenue dans la littérature.

Response of *Isochrysis* sp. glycolipids and constitutive fatty acids to Nitrogen limitation and Light/Dark cycle

Thomas Lacour^{*1,2}, Marc Boutoute^{1,2}, Antoine Sciandra^{1,2}, Patrick Mayzaud^{1,2}

1- Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, Unité Mixte de Recherche 7093,

Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

2- Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7093, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, Villefranche-sur-Mer, France

* Tel: +33 4 93 76 38 10; Fax: +33 4 93 76 38 48; E-mail: lacour@obs-vlfr.fr

Abstract

We investigated the relationship between glycolipids composition and growth characteristics in the microalga *Isochrysis* sp.. This relationship was successively studied at various levels of nitrate limitation and during light/dark cycles using chemostat and cyclostat culture systems respectively. We compared the fatty acid composition of glycolipids and the proportion of 3 glycolipid classes (MGDG, DGDG, SQDG) with some growth parameters measured in this study (growth rate, division rate, biomass composition) and photosynthetic parameters ($1/\tau$, P_{\max} , photosynthetic protein composition) obtained from literature. Glycolipid fatty acid unsaturation was closely related to C-specific growth rate in all conditions studied. Under light/dark illumination, we observed an accumulation of MGDG, DGDG and SQDG and a positive exponential relationship between MGDG/DGDG ratio and C-specific growth rate during the light period. In N-limited cultures we observed increases in both MGDG and SQDG cell content with increasing growth rate and clear negative linear relationships between MGDG/SQDG and some chloroplast proteins abundances (RC II, RCI and Cytb6/f).

We also found a positive linear relationship between FA desaturation index and photosynthetic efficiency. To conclude we suggest possible roles for the modification of glycolipid composition in the algal response to environmental changes.

Keywords: Isochrysis, N-limitation, Light/Dark cycle, glycolipid, Fatty acid, monogalactosyldiacylglycerol, digalactosyldiacylglycerol, sulfoquinovosyldiacylglycerol.

Abbreviations: MGDG, Monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; FA, Fatty acid; P_{\max} , Light-saturated Chl*a*-normalized photosynthetic rates; and $1/\tau$, the steady-state, light-saturated rate of electron turnover through a single active PSII reaction centre; RCI, Reaction centres of photosystem I; RCII, Reaction centres of photosystem II and Cyt*f*, Cytochrome b6/*f*.

1. Introduction

Collection of light by photosynthetic organisms and its transformation into chemical energy occur in the thylakoid membranes. Thylakoid membranes are highly organized structures composed of several protein complexes involved in the capture of light, photosynthetic electron flow and phosphorylation, and of different lipids types (Siegenthaler 1998). Acyl lipids are the second major components of the thylakoid membrane and consist of four classes (MGDG, DGDG, SQDG, and PG) which are found in all oxygen evolving photosynthetic organisms. Recent studies showed that chloroplast acyl lipids are not only an inert matrix into which membrane proteins are embedded, but had an essential role in the functioning of the photosynthetic apparatus through their interactions with proteins.

In natural environment, microalgae have to respond to important changes in physico-chemical conditions (light intensity, nutrient availability, temperature, etc.). A large part of the response consists in adapting the photosynthetic activity to new growth conditions. Many studies dealt

with the relationship between environmental conditions and photosynthetic parameters. Herzig and Falkowski (1989) and Falkowski et al. (1989) showed that Nitrogen limitation lead to a decrease in photosynthetic energy conversion efficiency and tried to put it in relation with changes in the abundance of protein complexes which constitute the photosynthetic apparatus in *Isochrysis galbana*. Other studies were interested in the influence of light intensity (Sukenik et al. 1990) and light/dark cycles (Behrenfeld et al. 1998, Bruyant et al. 2005) on photosynthetic parameters and related changes in chloroplast membrane, but few studies have addressed in the influence of environmental conditions on chloroplast lipids.

The role of chloroplast acyl lipids in the functioning of the photosynthetic apparatus has been the concern of many studies in higher plants (Quinn and Williams 1983, Siegenthaler and Trémolière 1998, Dörmann and Benning 2002, Yamamoto 2006). Several used mutants with altered lipid composition to understand the functional role of the lacking lipid. The assumption made was that modification of the acyl lipid composition was part of the photosynthetic acclimation to environmental changes. Three kinds of changes have been identified as important parameters in this response: changes in the quantity of total acyl lipids, changes in the proportions of the different classes of acyl lipids (MGDG, DGDG, SQDG, PG) and changes in their FA desaturation. Modification of FA desaturation in response to temperature regime was the most studied phenomena in higher plants (Routaboul 2000) and cyanobacteria (Gombos et al. 1992). Authors suggested that modulation of the desaturation allows cells to maintain the fluidity of the membranes when temperature changes. Mock & Kroon also showed modifications in chloroplasts lipids in response to Nitrogen starvation (2002a) and changes in light intensity (2002b) in sea ice diatoms.

In this study we examined the effects of steady state Nitrogen limited growth and light/dark cycle on glycolipid composition and glycolipid fatty acid constituents. The main objective

was to elucidate the link between glycolipid composition and growth to understand the possible roles of chloroplasts acyl lipids in photosynthesis.

2. Material and methods

Culturing system. We used unialgal culture of *Isochrysis* sp. (clone T-iso, called Tahitian *Isochrysis*, CCAP 927/14). The culture vessel consisted of 5L water-jacketed cylinders connected to a circulating water bath allowing maintaining a constant temperature of $22\pm0.1^{\circ}\text{C}$. The medium was prepared in several 20L tanks (Nalgene) filled with $0.22\ \mu\text{m}$ Millipore-filtered natural seawater and autoclaved at 110°C for 30 min. After cooling, sterile addition of nutrients was made according to the f/2 formulation (Guillard 1975), without nitrate, the limiting nutrient, which was added separately in the tanks. The renewing medium was added to the culture vessels through a $0.22\ \mu\text{m}$ sterile filter (SpiralCap, Gelman) by peristaltic pumps (Gilson).

Two different experiments were carried out. **Experiment 1** was conducted under light/dark regime to study the influence of the photoperiod on glycolipid composition. Cell density was first let to increase during a batch phase (dilution rate equal to zero) before adjusting the dilution rate to the maximum growth rate to stabilize the culture at a constant biomass concentration. During this turbidostat mode, the concentration of residual nitrate remained high in the culture. **Experiment 2** is a chemostat experiment and was conducted in duplicate in constant light (24h.d^{-1}) at different Nitrogen-limited growth rates to study the influence of N-limitation on glycolipid composition. After a non limited growth period in batch mode, turbidostat mode was operated as described above. After cell density stabilization, the two cultures were operated in chemostat mode. The dilution rate was then adjusted step by step at $0.2, 0.4, 0.6, 0.8$, and $1\ \text{d}^{-1}$ for several days.

Illumination was provided by two arrays of six 50 cm U-shaped, dimmable fluorescent tubes (Osram, dulux®, 2G11, 55W/12-950, lumilux de luxe, daylight) placed on each side of culture containers. The light spectrum and the photon flux density (PFD) controlling device are given in Bruyant et al. (2001). PFD was measured by a 2 Π spherical collector (QSL-100, Biospherical Instruments) immersed in the centre of the culture vessels. For experiment 1, the fluorescent tubes provided a smooth light-dark circadian cycle (12:12h) peaking at 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ that simulated diurnal light conditions. For experiment 2, light intensity was maintained at $430 \pm 30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Cultures were subjected to continuous gentle stirring and air bubbling to insure homogeneity.

Cell density and dissolved inorganic Nitrogen. High frequency monitoring of the chemostat cultures was performed throughout the experiments to obtain real-time information on the major variables of the cultures. Cell density and size distribution were automatically measured hourly with an optical particle counter using the principle of light blockage (Hiac/Royco, Pacific Scientific Instruments). Parallel measurements were also performed with a Multisizer 3 Coulter counter (Beckman) during intensive sampling periods. Cell concentration and biovolume were used to follow the culture variation in time. This information was essential to ensure that cultures reached desired steady states, i.e. when growth rate was equal to the dilution rate. NO_3 and nitrite (NO_2) concentrations were measured every 2 hours with a Technicon Auto-analyzer coupled to an automated data-acquisition system (Malara and Sciandra 1991). This system allowed to ascertain that cultures were not N-limited during the turbidostat mode.

Cellular and biochemical analyses. The concentrations of particulate Carbon (PC) and Nitrogen (PN) were determined every day on triplicate samples. 10 mL of culture were filtered onto glass-fiber filters (Whatman GF/C) precombusted at 500°C for 12 hours. Filters were kept at 60°C before elemental analysis with a CHN analyzer (Perkin Elmer 2400 Series

II CHNS/O). Carbohydrate and chlorophyll *a* concentrations were determined in duplicate or triplicate samples of 5 mL of culture filtered onto precombusted glass-fiber filters (Whatman GF/C). Total carbohydrate concentrations were analyzed by the phenol method (Dubois et al. 1956). *In vitro* Chlorophyll *a* was determined after extraction in a 2:3 mixture of dimethyl sulfoxide and 90% acetone (DMSO/acetone) using a Turner fluorometer (Model 10-AU-005-CE) (Shoaf and Lium 1976, Welschmeyer 1994). Total proteins were analyzed by the Lowry method (Lowry et al. 1951) using commercial reagents (kit Biorad DC Protein assay).

Total lipids were quantitatively extracted using the method of Bligh and Dyer (1959). After 2 initial extractions with a monophasic mixture of chloroform: methanol: water (1: 2: 0.8, v: v: v), chloroform and water were added for phase separation. Lipids are present in the chloroform phase which is evaporated. All lipid extracts were stored at -80°C until analysis. To avoid lipid auto-oxidation, a Nitrogen atmosphere was maintained at all time. Separation of neutral and polar (glycolipids and phospholipids) lipids was achieved on a preparative scale by column chromatography on silica gel (Extract-Clean, Alltech). The neutral lipid fraction was eluted with six column volumes of chloroform. Glycolipid fraction was eluted with 4 column volumes of acetone and phospholipid fraction with 5 volume of Methanol and 2 volume of Methanol/Ammonia (90:10). All the fractions were evaporated and weighted.

Glycolipids were quantified after chromatographic separation coupled with Flame ionization detection on an Iatroscan MK V TH 10. Glycolipids were applied to SIII chromarods using a SAS A4100 autospotter set up to deliver 1 μL of chloroform extract on each rod. Analyses were done in triplicate. Separation of glycolipids was achieved with chloroform/ethyl acetate/acetone/methanol/acetic acid/water (60/12/15/16/3/3). Calibration was achieved using commercial standards.

Fatty acid methyl esters (FAME) of glycolipids were prepared with 7% boron trifluoride in methanol. Gas chromatography (GC) of all esters was carried out on a 30 m length x 0.32 mm

internal diameter quartz capillary column coated with Famewax (Restek) in a Perkin-Elmer XL Autolab GC equipped with a flame ionization detector (FID). The column was operated isothermally at 185°C for FAME. Helium was used as carrier gas at 7 psig. Injector and detector were maintained at 250°C. Individual components were identified by comparing retention time data with those obtained from authentic and laboratory standards. In addition to the examination of FAME as recovered, a part of all FAME samples was completely hydrogenated and the products examined qualitatively and quantitatively by GC. The level of accuracy is $\pm 5\%$ for major components, 1 to 9% for intermediate components and up to $\pm 30\%$ for minor components.

FA desaturation index was defined to reflect the desaturation of glycolipid fatty acids and computed as follow:

$$\text{FA desaturation} = (\text{Polyunsaturated}) / (\text{saturated} + \text{Monoene})$$

Growth rate. Growth rate can be computed from the time variations of either the biomass (Carbon basis) or the cell number (cell basis). The following equations represent the net C-specific growth rate μ_C (1) and the cell division rate μ_{Cell} (2) estimated between two discrete data acquisitions performed at times t_1 and t_2 at a given dilution rate D :

$$\mu_C = \frac{\ln\left(\frac{C_C(t_2)}{C_C(t_1)}\right)}{t_2 - t_1} + D \quad (\text{d}^{-1}) \quad (1)$$

$$\mu_{\text{Cell}} = \frac{\ln\left(\frac{\text{Cell}(t_2)}{\text{Cell}(t_1)}\right)}{t_2 - t_1} + D \quad (\text{d}^{-1}) \quad (2)$$

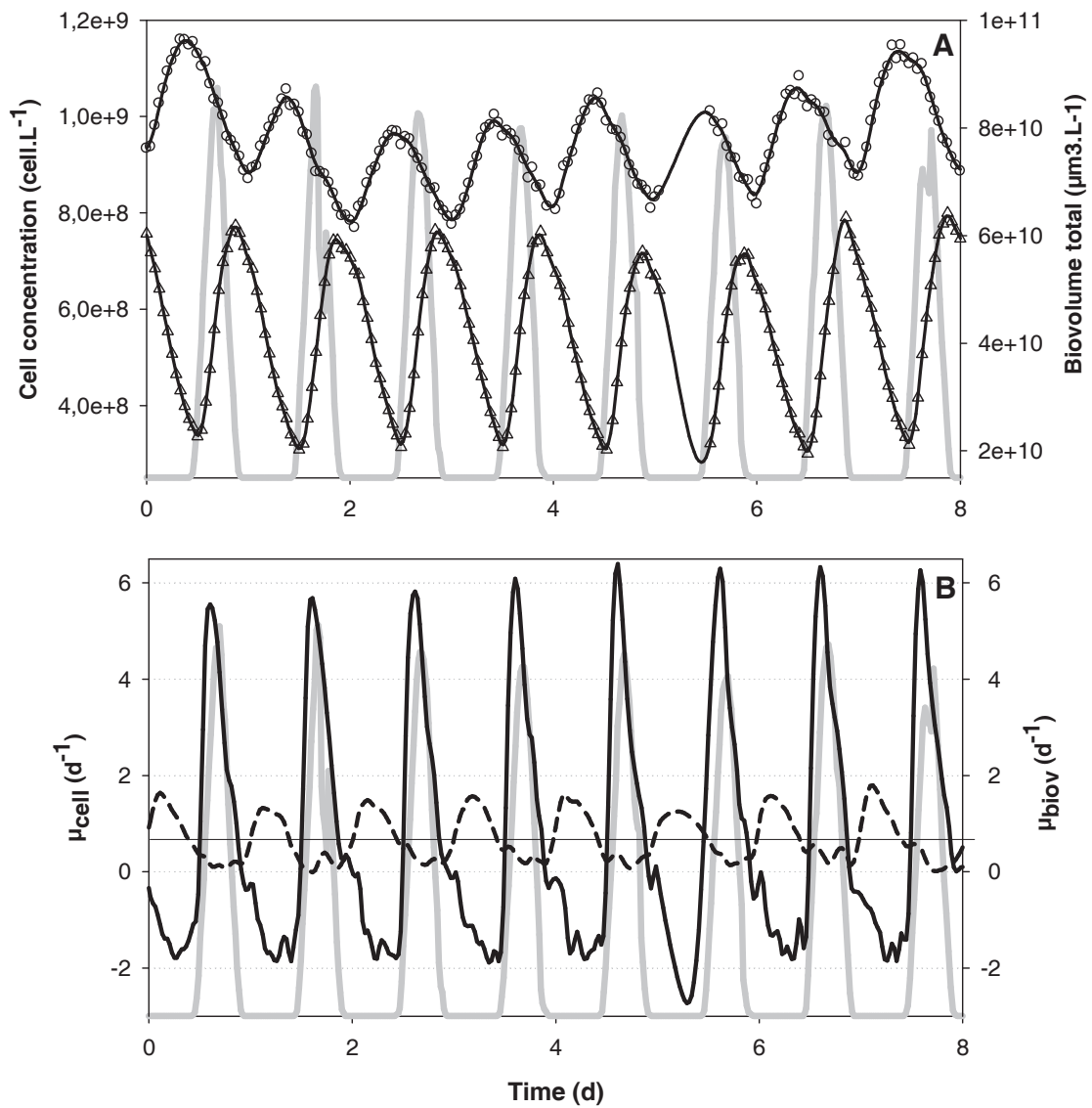


Figure 1: Variations in cell concentration (circles) and total biovolume concentration (triangles) (A) and cell division rate (dashed line) and biovolume variation rate (solid line) (B) in a culture (Experiment 1) under light dark illumination (grey line). In B, horizontal line represents the daily averaged μ_{cell} and μ_{biov} (0.7 d^{-1}).

3. Results

3.1 L/D cycle, Experiment 1

3.1.1 Physiology: cell growth and division

The daily averaged cell division rate was 0.7 d^{-1} which corresponds to 1 division per day. Division rate was not constant during light/dark cycle because population was synchronized (after several days exposed to alternating light regime) (Figure 1A, B). Maximum division rate occurred between 00:00 and 02:00, and the lowest rates were always greater than zero. Total biovolume also presented variations in response to light/dark illumination. Total biovolume increased during the day and decreased during the night (Figure 1A). Daily averaged biovolume variation rate was 0.7 d^{-1} , as division rate. Biovolume variation rate was positive during the day, negative during the night, and null at midday (Figure 1B), reflecting that population biomass grew during the day and that a part of the biomass was respired during the night.

Variation in C-specific growth rate was consistent with these observations. Daily averaged C-specific growth rate was also 0.7 d^{-1} . The rate was high during the photosynthetically-active light period and negative during the dark period (Figure 3C). Maximal C-specific growth rate occurred at midday when light intensity was maximal. Both Carbon and biovolume instantaneous variation rates are closely related to light intensity.

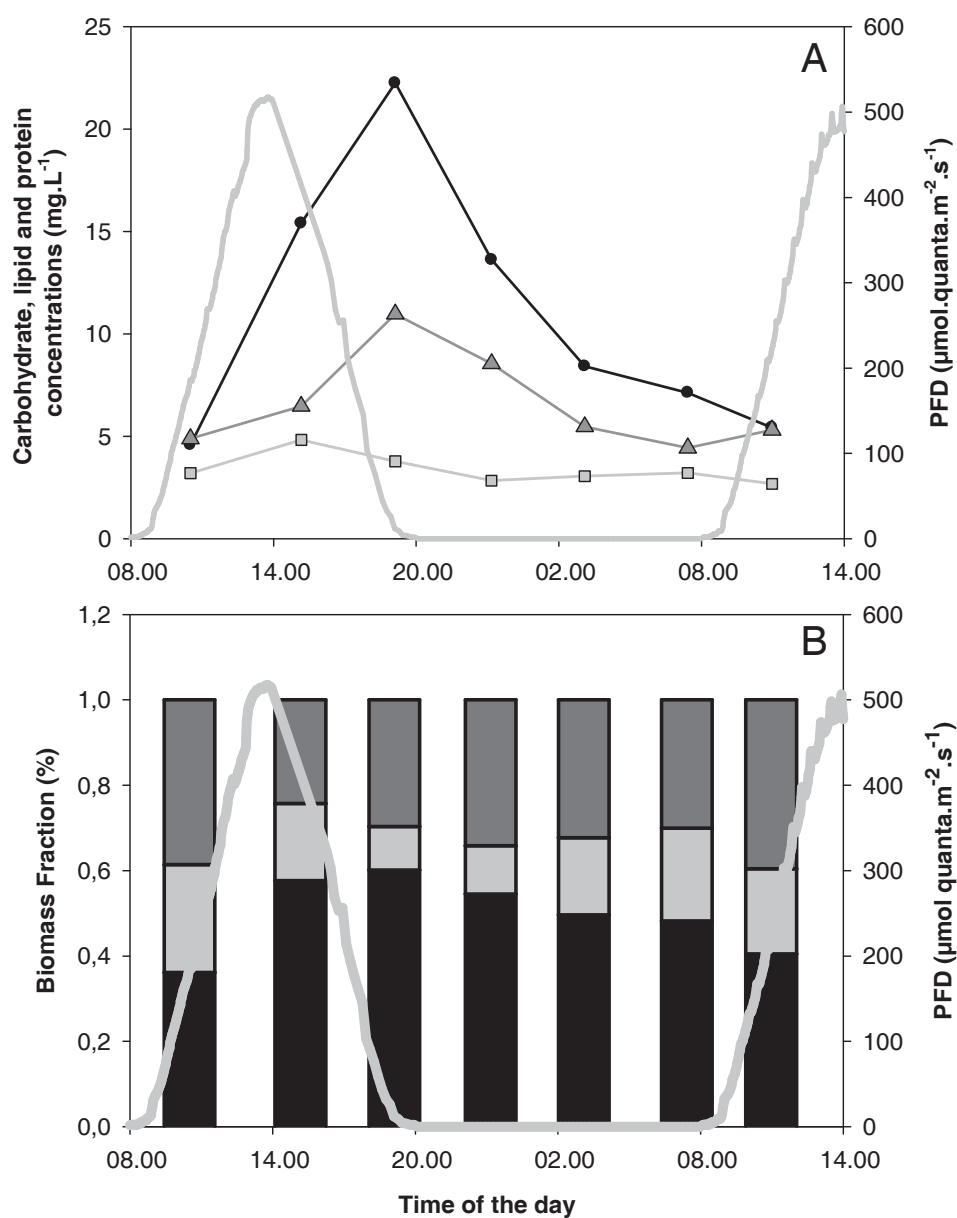


Figure 2: Variations in total lipids (triangles), proteins (squares) and carbohydrates (circles) concentrations under light/dark illumination (A). Variations in total lipids (deep grey bars), proteins (grey bars) and carbohydrates (black bars) proportions under light/dark illumination (B). (Experiment 1). Fractions are relative to the sum of carbohydrates, lipids and proteins.

During the light period, cells accumulated carbohydrates, and, to a lesser extent, lipids (Figure 2A). Proteins were synthesized during the dark and in the morning. These differences in production and consumption resulted in variations in biomass composition (Figure 2B). The carbohydrate fraction increased during the day and decreased during the night. Protein fraction increased during the night and decreased during the day. Lipids fraction had intermediate evolution, increasing during the afternoon and decreasing during the night.

3.1.2 Glycolipid composition

Cellular glycolipid increased during the light period and decreased during the night but total glycolipids to Carbon ratio remained stable along the diel cycle (not shown for manuscript, Fig 4 Chapter 5) suggesting that the observed variations in cell glycolipid were directly associated with cell growth and division.

MGDG, DGDG and SQDG cell contents increased during the light period and decreased during the dark (Figure 3A). MGDG to DGDG ratio was high in the morning and low during the rest of the day (Figure 3B). MGDG to SQDG ratio was maximal at the end of the light period and decreased during the night (Figure 3B).

As MGDG always represented more than 95% of total glycolipid, the measured glycolipid fatty acid distribution should be close to MGDG fatty acid composition. Glycolipids fatty acid composition (Table 1) was dominated by 14:0 (11-21%), 16:0 (5-9%), 18:1 ω 9 (7-12%), 18:4 ω 3 (24-32%), 18:5 ω 3 (9-17%) and 22:6 ω 3 (3-5%) and varied strongly with the L/D cycle. Saturated fatty acid (14:0; 16:0) proportions increased by 34 % during the day and then decreased until the end of the night. This increase could be associated with *de novo* synthesis.

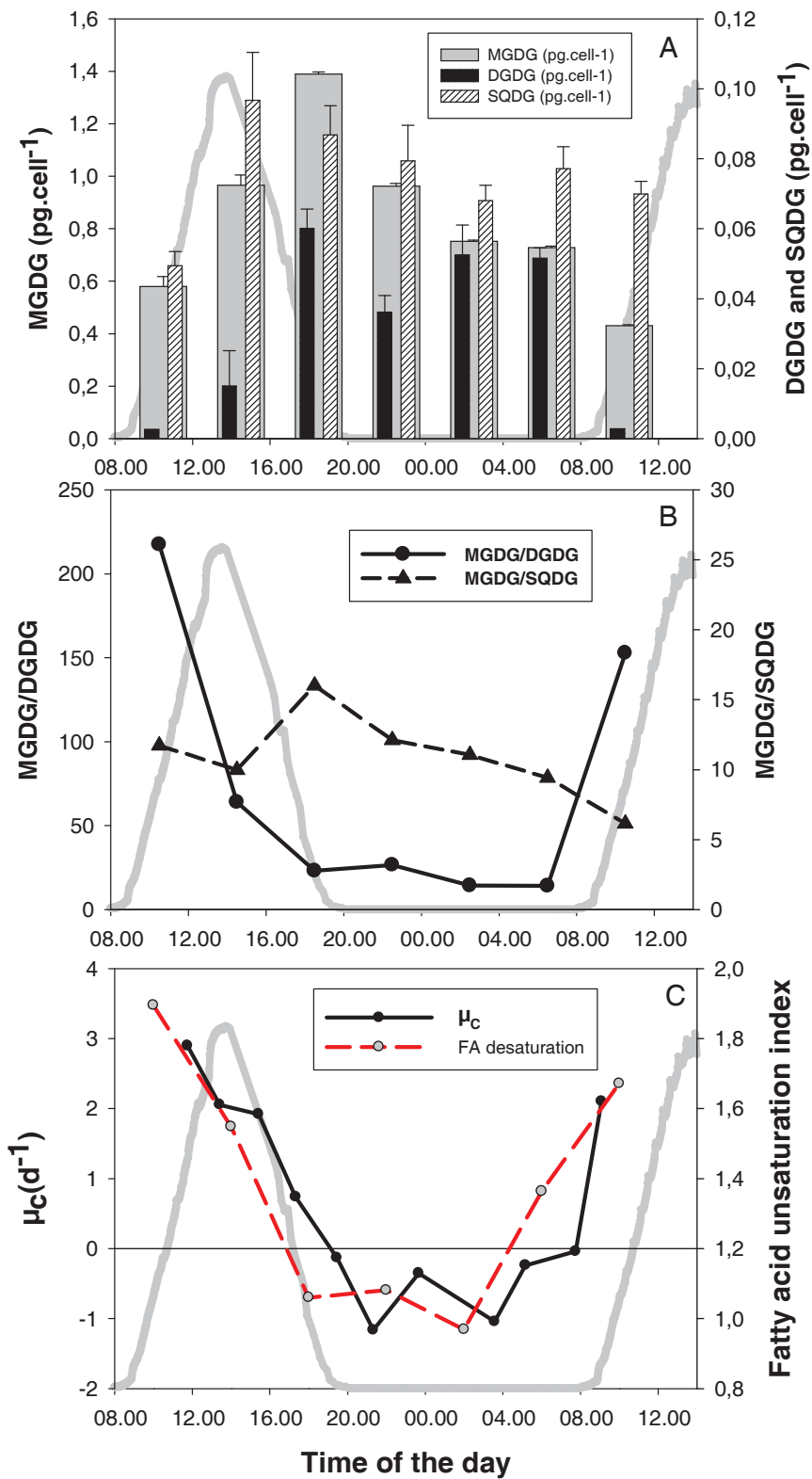


Figure 3: Glycolipid class variation in Experiment 1 (every 4 h, starting from 10 :00) (A) MGDG (grey bars), DGDG (black bars) and SQDG (white striped bar) cell content (pg.cell⁻¹). (B) MGDG to DGDG (circles) and MGDG to SQDG (triangles) ratios. (C) FA desaturation index and C-specific growth rate (d⁻¹) during the light dark cycle.

Monoene and diene proportions increased by 30% and 18 % respectively between 10:00 and 03:00 and then decreased until the end of the dark period. Glycolipids had maximal proportions of 18:4 ω 3 and 18:5 ω 3 in the morning (10:00). 18:4 ω 3 proportions decreased by 23% between 10:00 and 19:00, remained stable between 19:00 and 03:00 and increased between 03:00 and 10:00. 18:5 ω 3 decreased by 47 % between 10:00 and 03:00 and then came back to its initial level. All these changes resulted in important modification of FA desaturation index which decreased during the light period and increased during the dark period, with a maximum in the morning and a minimum level on the onset of the dark period (Figure 3C). Changes in FA composition during L/D cycle were probably linked to *de novo* synthesis of saturated fatty acids during the light period. Interestingly, the variations in MGDG to DGDG ratio and FA desaturation index were similar to the variation in C-specific growth rate (Figure 3C). The desaturation index and the MGDG fraction were in good correlation with the C-specific growth rate, but total glycolipid content (mostly MGDG) was inversely related to the C-specific growth rate.

Table 1: Fatty acid composition of *Isochrysis* sp. glycolipids (% total glycolipids) at different time of the day during the light/dark cycle. Only fatty acids with proportion higher than 0.1 % are presented here.

Time of the day	10:00	14:00	18:00	22:00	2:00	6:00	10:00
Fatty acid							
14:0	13.48	11.82	18.38	20.78	19.64	15.32	11.77
15:0	0.18	0.21	0.67	0.25	0.32	0.21	0.28
16:0	5.17	8.02	9.02	7.12	8.24	6.53	6.85
18:0	0.61	0.82	1.47	0.70	1.32	0.71	0.91
22:0	0.03	0.04	0.07	0.04	0.12	0.02	0.05
Total Saturated	20.47	21.37	30.95	29.63	30.79	23.56	21.23
14:1 ω 5	0.80	0.41	0.98	0.84	0.80	0.86	0.54
16:1 ω 9	0.33	0.34	0.39	0.31	0.59	0.41	0.43
16:1 ω 7	3.31	2.24	3.10	2.92	3.57	2.88	3.86
16:1 ω 5	0.21	0.20	0.22	0.23	0.42	0.57	0.48
18:1 ω 9	7.77	12.68	11.15	12.02	12.46	11.93	8.59
18:1 ω 7	0.71	1.08	1.08	1.30	1.37	1.14	0.94
18:1 ω 5	0.30	0.30	0.43	0.43	0.40	0.24	0.44
19:1 ω 8	0.15	0.21	0.08	0.12	0.11	0.64	0.27
Total monoene	14.07	17.87	17.60	18.42	20.01	18.75	16.20
16:2 ω 6	0.97	0.70	0.65	0.77	0.85	0.95	0.84
16:2 ω 4	0.49	0.28	0.29	0.38	0.40	0.43	0.51
18:2 ω 6	2.50	3.56	3.57	3.73	3.93	3.28	2.50
20:2 ω 6	0.52	0.51	0.30	0.35	0.26	0.32	0.39
Total diene	4.47	5.05	4.81	5.23	5.43	4.97	4.24
16:3 ω 4	0.19	0.14	0.12	0.17	0.13	0.14	0.16
18:3 ω 6	0.84	1.01	0.68	0.77	0.98	0.84	0.86
18:3 ω 3	2.92	3.65	2.34	2.59	2.93	3.18	4.08
20:3 ω 3	0.34	0.35	0.25	0.26	0.18	0.22	0.38
Total Triene	4.46	5.32	3.56	3.98	4.35	4.47	5.68
16:4 ω 3	0.13	0.11	0.11	0.11	0.14	0.13	0.28
18:4 ω 3	32.01	28.17	24.33	24.28	24.03	29.06	30.63
18:4 ω 1	1.79	0.95	1.32	0.39	0.46	1.00	1.23
20:4 ω 6	0.04	0.07	0.04	0.13	0.03	0.01	0.05
20:4 ω 3	0.03	0.09	0.04	0.03	0.02	0.01	0.43
22:4 ω 6	0.06	0.07	0.07	0.09	0.07	0.01	0.01
Total Tetraene	34.19	29.54	25.98	25.07	24.83	30.27	32.70
18:5 ω 3	17.21	14.61	12.35	10.07	9.07	12.88	15.36
20:5 ω 3	0.30	0.61	0.52	0.47	0.27	0.27	0.44
21:5 ω 3	0.19	0.15	0.08	0.12	0.15	0.12	0.18
22:5 ω 6	0.60	0.74	0.48	0.82	0.70	0.61	0.51
22:5 ω 3	0.15	0.14	0.14	1.31	0.12	0.08	0.12
Total Pentaène	18.45	16.25	13.58	12.79	10.31	13.95	16.62
22:6 ω 3	3.89	4.61	3.52	4.88	4.28	4.04	3.33

Table 2: Fatty acid composition of *Isochrysis* sp. glycolipids (% total glycolipids) at different C-specific growth rates (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1). Only fatty acids with proportion higher than 0.1 % are presented here.

Growth rate (d⁻¹)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Fatty acid						
14:0	15.25	14.08	17.56	20.15	20.05	14.15
15:0	0.24	0.24	0.28	0.27	0.26	0.13
16:0	9.54	12.21	11.76	11.77	9.65	6.72
18:0	0.65	3.50	1.92	1.80	1.24	0.99
22:0	0.10	0.12	0.04	0.05	0.00	0.06
Total saturated	26.22	30.67	32.15	34.61	32.04	22.92
14:1 ω 5	0.27	0.33	0.49	0.58	0.62	0.44
16:1 ω 9	0.54	0.20	0.41	0.46	0.37	0.28
16:1 ω 7	1.51	1.88	2.97	2.56	1.71	1.19
16:1 ω 5	0.15	0.20	0.45	0.37	0.24	0.22
18:1 ω 9	27.33	23.83	20.61	18.94	18.03	17.68
18:1 ω 7	4.23	2.85	2.14	1.65	2.08	2.19
18:1 ω 5	0.34	1.96	0.54	0.73	0.71	0.61
Total Monoene	34.69	31.32	28.12	25.57	24.01	23.04
16:2 ω 6	0.12	0.14	0.54	0.53	0.38	0.35
16:2 ω 4	0.18	0.24	0.74	0.53	0.29	0.14
18:2 ω 6	4.87	5.42	5.01	5.00	5.07	6.26
20:2 ω 6	0.15	0.11	0.17	0.20	0.35	0.44
Total diene	5.32	5.90	6.46	6.27	6.08	7.18
16:3 ω 4	0.03	0.02	0.23	0.15	0.14	0.06
18:3 ω 6	0.25	0.50	0.57	0.87	0.59	0.88
18:3 ω 3	2.59	2.51	2.08	2.26	2.76	2.46
20:3 ω 3	0.04	0.02	0.10	0.09	0.05	0.18
Total triene	3.14	3.28	3.25	3.55	3.71	3.86
16:4 ω 3	0.04	0.03	0.02	0.01	0.09	0.06
18:4 ω 3	17.20	18.06	18.58	19.56	20.89	23.20
18:4 ω 1	0.18	0.22	0.44	0.25	0.35	0.57
Total tetraene	17.58	18.48	19.50	20.16	21.67	24.17
18:5 ω 3	3.23	2.78	3.92	4.28	5.58	11.12
20:5 ω 3	0.08	0.09	0.11	0.15	0.16	0.36
21:5 ω 3	0.44	0.39	0.22	0.19	0.21	0.28
22:5 ω 6	1.41	1.33	1.13	0.83	0.99	1.03
22:5 ω 3	0.07	0.04	0.16	0.11	0.35	0.27
Total Pentaene	5.23	4.64	5.54	5.55	7.30	13.07
22:6 ω 3	7.82	5.72	4.97	4.28	5.18	5.76

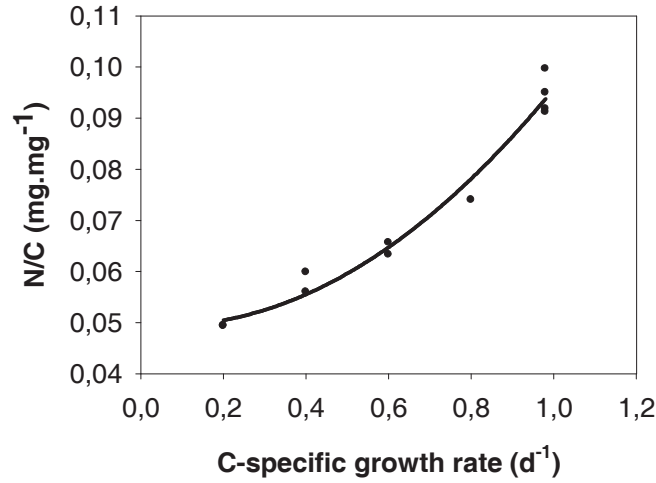


Figure 4: Nitrogen to Carbon ratio at different C-specific growth rates (d⁻¹) (Experiment 2).

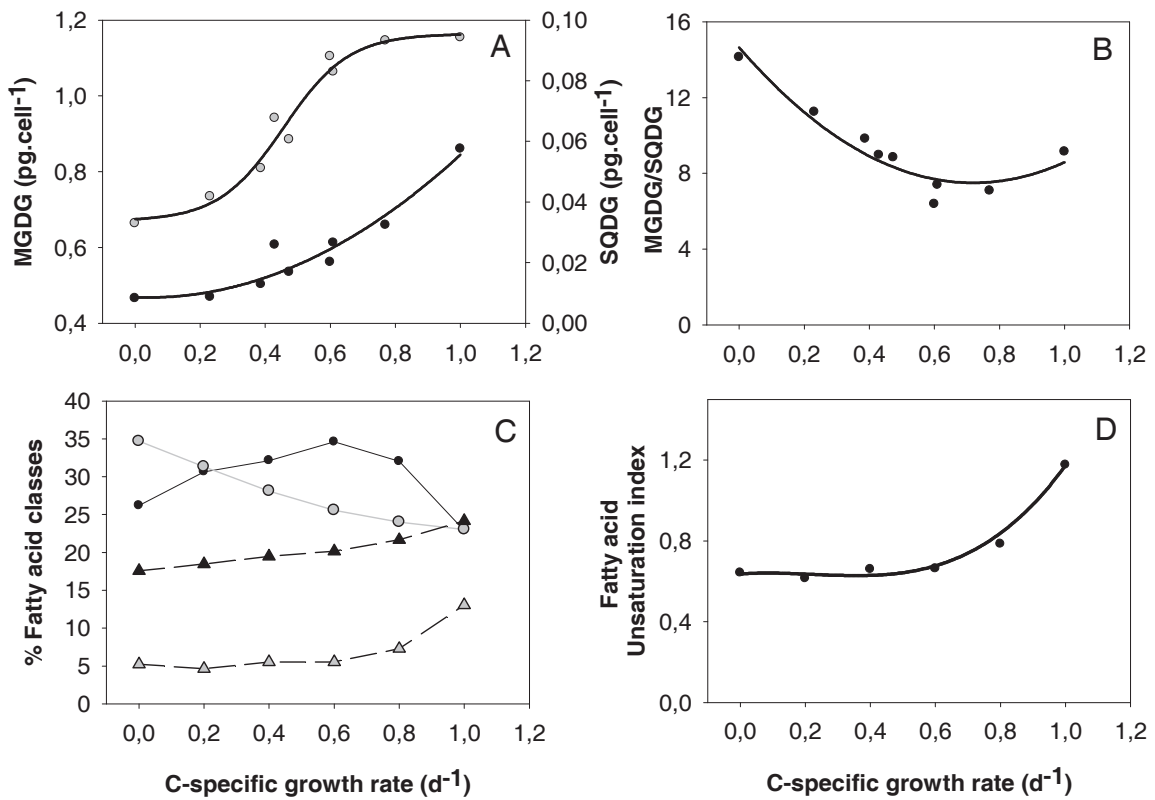


Figure 5: MGDG (black circles, left axis) and SQDG (grey circles, right axis) cellular content (pg.cell⁻¹) (A), MGDG/SQDG ratios (B), proportions of saturated (black circles), monoenes (grey circles), tetraenes (black triangles) and 22:6ω3 (grey triangles) in glycolipids (C) and FA desaturation index (D) at different C-specific growth rates (*i.e.*, degrees of N-deficiency).

3.2 Nitrate limitation: Experiment 2

3.2.1 Physiology :

We observed a significant response of the N quota (N/C ratio) to the dilution rate changes, as predicted by the cell quota model (Droop 1968). Indeed, N quota increased with dilution rate (Figure 4). On Figure 4, it appears that the C-specific growth rate (μ_c) measured at steady state was well related to N quota by the Droop relationship. The different growth rates corresponded to different levels of Nitrogen limitation.

3.2.2 Glycolipid composition

MGDG and SQDG cell contents decreased by 46% and 65 % respectively when increasing N-limitation from $1d^{-1}$ to $0 d^{-1}$ (Figure 5A). The MGDG to SQDG ratio increased with N-limitation (Figure 5B). DGDG was very low at all growth rates, undetectable in many samples and consequently was not presented here.

Comparison of mean fatty acid compositions in continuous and alternative light regimes shows that, in N-sufficient conditions ($\mu_c=1d^{-1}$), the proportions of $18:4\omega3$ and $18:5\omega3$ are smaller under continuous light, whereas proportions monoenes and dienes are higher, which accounts for the smaller FA desaturation index (1.17).

Fatty acid composition of glycolipid was also affected by N-limitation (Table 2, Figure 5C). Saturated fatty acids increased with growth rate excepted in N-sufficient growth ($\mu=1d^{-1}$) when their proportion were reduced (22.92%). Monoene proportion decreased with growth rate contrary to the dienes and trienes percentages. $18:4\omega3$ and $18:5\omega3$ increased linearly with growth rate and the latter was particularly high in N-sufficient conditions. $22:6\omega3$ proportion decreased with growth rate between 0 and $0.6 d^{-1}$ and remained at an intermediate level in non limited growth. The resulting FA desaturation index (Figure 5D) remained stable at 0.64 ± 0.02 between 0 and $0.6 d^{-1}$ and was much higher in non N-limited growth (Figure 5D)(1.17).

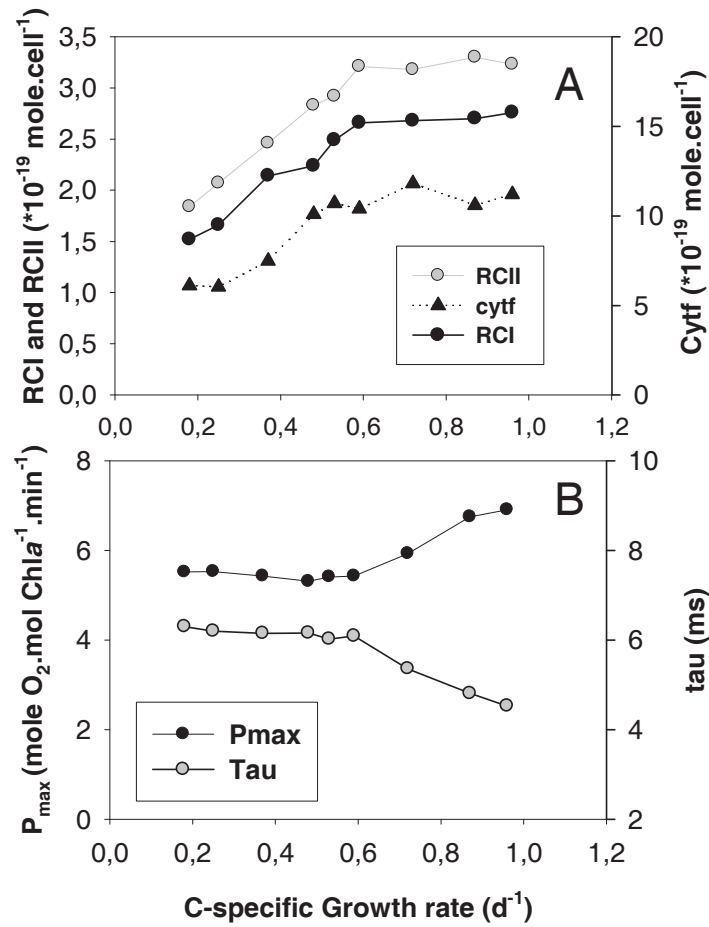


Figure 6: Reaction centres of photosystem I (RCI, black circles) and II (RCII, grey circles) and Cytochrome b6/f (Cytf, black triangle) cellular contents (A) and P_{max} (black circles) and tau (grey circles) (B) at different C-specific growth rates (i.e., degrees of N-deficiency). Data were adapted from Falkowski et al. (1989) and Herzig and Falkowski (1989).

3.2.3 Photosynthetic proteins composition and efficiency parameters.

Steady state N-limitation has important effect on photosynthetic characteristics, growth efficiency and relative abundance of chloroplast proteins (Herzig and Falkowski (1989) and Falkowski *et al.* (1989)). Figure 6A, which presents some data adapted from Falkowski *et al.* (1989), shows that reaction centres of photosystem I and II and cytochrome b6/f cellular contents increase with growth rate. P_{\max} per unit of Chl a remains relatively constant between 0.2 and 0.6 d⁻¹ and increases with growth rate between 0.6 and 1 d⁻¹ (Figure 6B). The average turnover time for light-saturated photosynthetic electron transport from water to carbon dioxide, τ , remains constant between 0.2 and 0.6 d⁻¹ and decreases with growth rate between 0.6 and 1 d⁻¹.

4. Discussion

Glycolipids are the main glycerolipids of chloroplast membranes. Membrane glycerolipids organize themselves in structures that depend on their shape and on the presence of other components (proteins, cholesterol, *etc.*). Glycerolipid shape is determined by the nature of their polar head (size and polarity) and by the length and desaturation of their fatty acids (Siegenthaler 1998). MGDG is a “non bilayer forming lipid” that can nevertheless form bilayers in presence of high amount of proteins. DGDG and SQDG are bilayer forming lipids. Chloroplast (especially thylakoid) membranes have a very high protein to lipid ratio and consequently can support very high proportion of MGDG and unsaturated fatty acid. The proportion of MGDG, desaturation and length of glycolipid fatty acid together with the abundance of proteins in the membranes are important parameters that determine the structure of their lipid phase (crystal, fluid gel). In general, high amount of MGDG and high FA desaturation tend to form fluid disorganized membranes and the presence of proteins tends to decrease membrane fluidity. The membrane structure plays an important role in the regulation of the activity of the proteins that are embedded therein (De Kruljff 1997). Some studies showed that many glycerolipids have specific interactions with chloroplast proteins suggesting direct roles in the modulation of their activity (Quinn and Williams 1983, Jones 2007). Phytoplankton cells have developed sophisticated mechanisms to survive in fluctuating environments with photosynthetic acclimation being one of the most important processes. The close contact between chloroplast acyl lipids and photosystem complexes suggest a strong structure-function interdependence between them. Acyl lipids are potential modulators in photosynthetic acclimation to environmental changes.

A crucial parameter that modifies cell physiology is Nitrogen availability. The negative effect of N-limitation on photosynthesis has been demonstrated as a reduced efficiency of the

photosystems fluorescence yield (Falkowski *et al.* 1989, Herzig and Falkowski 1989, Geider and La Roche 1993). Under steady state conditions, the degree of N-limitation defines the net photosynthetic rate (Osborne and Geider 1986, Turpin 1991). To try to understand the relationship between glycolipid composition and photosynthetic characteristics, we have chosen to interpret the results of the present study in the light of the experiments performed by Herzig and Falkowski (1989) and Falkowski *et al.* (1989) who used similar cultures of *Isochrysis galbana* to investigate the effects of N limitation on photosynthetic properties, growth efficiency and chloroplast proteins abundance (Figure 6A, 6B). In our experiment, both MGDG and SQDG cell contents increased with the N-limited growth rate. Cells growing at 0.2 d⁻¹ contained 45 % less MGDG than cells growing at 1 d⁻¹. Very interestingly, Falkowski *et al.* (1989) showed that over the same range of N-limited growth rate, Photosystem I and Photosystem II reaction centres and cytochrome b₆/f abundances decreased by 43%, 45% and 45% respectively (Figure 6B). These observations show the very close functional relationship existing between the amount of photosynthetic protein complexes and the amount of acyl lipid in which they are embedded. As shown by White *et al.* (2001), the inclusion of proteins in membranes results in “bilayer effects” that change their properties. Increases in MGDG and SQDG probably support the increase in membrane proteins by maintaining thylakoid membrane function. The loss of photosynthetic protein functionality by a change of their lipidic environment may consequently be instrumental in accelerating their subsequent elimination by plastidic house-keeping processes. Sukenik *et al.* (1990) also demonstrated a concomitant increase in MGDG and chloroplast proteins concentrations (RC II and LHCII) after a decrease in light intensity, suggesting a tight regulatory relation between them. In accordance with our present results, Mock and Kroon (2002a) demonstrated that N-limited cells have lower MGDG and SQDG content than N-sufficient cells.

We also observed (data not shown) lower MGDG to SQDG ratios at higher growth rates, and significant negative linear relationships between MGDG/SQDG and RC II, RCI and Cytb6/f ($n=7$, $R^2=0.71$; 0.65 and 0.60, respectively). All these observations emphasize the fine regulation of glycolipid class composition during environmental changes. Despite its very low concentration, SQDG is likely to play an important role in the regulation of thylakoid acclimation to changes in growth conditions.

We also have shown that Nitrogen limitation leads to a marked decrease in FA unsaturation that is in line with the work of Mock and Kroon (2002a) who described a decrease in MGDG polyunsaturated FA and an increase in MGDG monoene in response to Nitrogen limitation. We compared the FA desaturation index with light-saturated Chl a -normalized photosynthetic rates ($P_{\max, \text{Chl}a^{-1}}$) and with $1/\tau$, the steady-state, light-saturated rate of electron turnover through a single active PSII reaction centre obtained by Herzig and Falkowski (1989) at very similar rates. We found a positive linear relationships between FA desaturation index and P_{\max} ($n=6$; $R^2=0.81$) and $1/\tau$ (ms) ($n=6$; $R^2=0.93$), respectively. These relationships may be linked to different processes. At maximal growth rate, cell may increase its glycolipids FA unsaturation to provide a more fluid environment in which the diffusion processes of photosynthetic electron transfer become faster. Mock and Kroon (2002a) showed a similar relation between the velocity of electron transport from reaction centres through the plastoquinone pool and the desaturation of chloroplast FAs. Higher desaturation of chloroplast acyl lipids is supposed to provide a more anhydrous and fluid environment that allows an increased mobility of electron transport carriers (as the hydrophobic plastoquinone and the electron transport membrane proteins). These increased fatty acid unsaturation may also be implicated in membrane structure modifications that allow the optimal packing of PS II reaction centres and their association state with their corresponding light harvesting complexes in thylakoid or lamella membranes. The acyl lipid composition (class and FA

desaturation) is tightly regulated to acclimate to new photosynthetic activity imposed by new growth conditions.

The illumination regime is also a crucial constraint in cell physiology (Prezelin 1992). Cells accumulate Carbon, energy and reducing power during the light period to grow and divide. Alternating illumination leads to the synchronization of cells population and thus to the overlap of the cell cycle over the photoperiod (Chisholm and Costello 1980). We showed in this study that MGDG, DGDG and SQDG accumulated in cells during the light period with maximum cellular content at the end of the day. This is in agreement with the work of Sukenik and Carmeli (1990) who demonstrated that MGDG was only synthesized during the light period by *Nannochloropsis* sp.. The observed increase in glycolipid cellular content during the day (Figure 3A) is most probably associated with chloroplast biogenesis and cell growth; conversely, the decrease in cellular content is likely associated with the partitioning of chloroplasts between daughter cells during cell division. Gillard *et al.* (2008) showed a close coupling between chloroplast growth and cell cycle in the pennate diatom *Seminavis robusta*. Some studies also showed that the timing of chloroplast growth and division is controlled by the photoperiod (Doran and Cattolico 1997) with an accumulation of chloroplast materials during the light period which is in line with our present results.

Chloroplast lipid increase was not linked to increased photosynthetic activity as maximal C-specific growth rates were measured at midday. Different authors showed that photosynthetic capacity is not directly related to thylakoid size, Chl*a* or photosynthetic apparatus components content under alternating light (Prezelin 1992, Kaftan *et al.* 1999). In this study we could link cell growth and C-specific growth rates with the compositions of glycolipids and their FA content. Chloroplast membranes are characterized by high proportions of MGDG and polyunsaturated fatty acids (Siegenthaler 1998) in agreement with the present study (18:4 ω 3 and 18:5 ω 3 can represent 49% of total glycolipid fatty acids, Tables 1&2). We showed that

polyunsaturated FA proportions decreased during the day and increase during the night. The observed variations were likely due to the light-induced *de novo* synthesis of monoene and saturated FA, which stopped at the end of the day. Indeed, Kis *et al.* (1998) demonstrated induction by light of fatty acid desaturase genes in *Synechocystis* PCC 6803. The decrease in FA desaturation during the light is probably due to an imbalance between FA *de novo* synthesis and FA desaturation.

We found a positive linear relationship ($n=4$, $R^2=0.99$) between membrane glycolipid FA unsaturation and specific C-specific growth rate, and a positive exponential relationship ($n=4$, $R^2=0.99$) between MGDG/DGDG ratio and C-specific growth rate (d^{-1}) during the day, showing the tight link that exists between photosynthesis activity and glycolipid composition. These observations may be attributed to the increasing needs for membrane fluidity at high growth rate. As mentioned above, the increased fluidity is required for effective mobility of electron transport carriers in support of high photosynthetic rates. Kaftan *et al.* (1999) demonstrated that limited PS II activity in *Scenedesmus quadricauda* was responsible for the decline in photosynthetic activity observed in the afternoon. Low FA unsaturation and MGDG/DGDG ratio may account for the low PSII activity and low photosynthetic activity observed in this study.

Our data support the idea that modifications in glycolipid composition are linked to changes in photosynthetic characteristics when growth conditions are modified (L/D cycle, N-limitation). Increase in glycolipid content should allow cells to maintain thylakoid membrane homeostasis when membrane protein concentration increases. Likewise, FA unsaturation allows cell to sustain high photosynthetic activity in view of the similar effects observed upon L/D cycle and N-limited growth. Despite their very low concentrations, DGDG and SQDG appear to play significant modulatory roles in photosynthetic membranes to promote effective response to environmental changes.

VII. Discussion générale: L'acclimatation lipidique des algues : rôle des TAG et des glycolipides



Photo réalisée sur microscope confocal (gauche) et sur microscope optique (droite) de cellules d'*Isochrysis* sp. marquées au Nile red. Les gouttelettes lipidiques sont marquées en jaune alors que les membranes sont marquées en orange.

Sommaire

1- L'ACCLIMATATION AUX CONTRAINTES DU MILIEU.....	225
2- LA REPONSE LIPIDIQUE AUX CONTRAINTES DU MILIEU : RAPPEL DES RESULTATS OBTENUS.....	226
2.1 Les réserves énergétiques des algues	226
2.1.1 Le stockage de réserves	227
2.1.2 La consommation des réserves	229
2.2 Les glycolipides.....	231
3. LES ALGUES POUR PRODUIRE DU BIOCARBURANT	233
3.1 Quota vs. Productivité	233
3.2 Le cycle lumineux diurne : un paramètre crucial	236
3.3 La qualité des huiles produites.....	236
4. PERSPECTIVES : LA CAPACITE A STOCKER DES LIPIDES : UN AVANTAGE COMPETITIF ?.....	237
4.1 Influence des lipides sur la croissance	237
4.1.1 Dans un environnement non limité, en lumière continue	239
4.1.2 En régime nutritif variable.....	239
4.1.3 En cycle Jour/Nuit	242
4.1.4 Des expériences à réaliser	243
4.2 Rôle des réserves dans la flottabilité.....	244

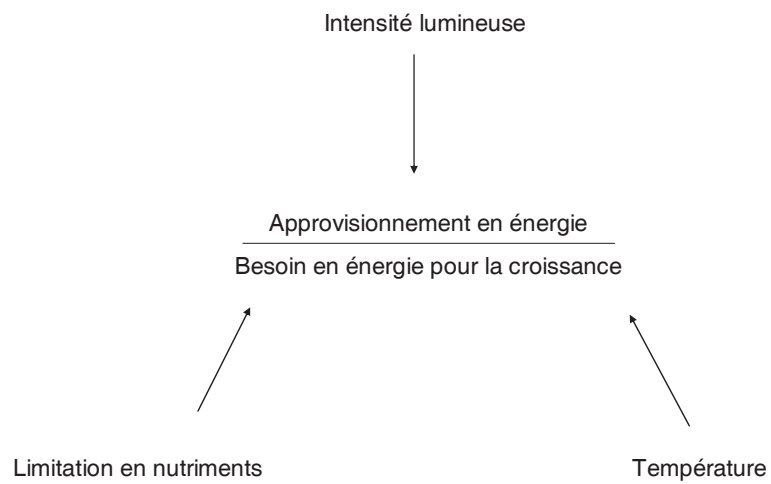


Figure 1 : Schéma synthétique résumant l'influence des conditions environnementales sur l'équilibre énergétique de la cellule. Celui-ci peut être modifié par une variation de l'intensité lumineuse, de la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance et de la température. Les différentes stratégies adaptatives permettent de rétablir cet équilibre.

1- L'acclimatation aux contraintes du milieu

Les microalgues évoluent dans des environnements changeants et leur capacité à s'adapter à de nouvelles conditions de croissance est déterminante pour leur survie (Durnford and Falkowski 1997). On peut identifier deux types de modification des conditions de croissance : les changements qui impactent le flux d'énergie et de carbone entrant dans la cellule (essentiellement l'intensité lumineuse) et les changements qui modifient la capacité des algues à utiliser l'énergie disponible pour croître (essentiellement les limitations par les nutriments et la température). Ces deux types de modification provoquent des déséquilibres entre le flux d'énergie entrant dans la cellule et son utilisation pour alimenter la croissance (Figure 1). Les cellules phytoplanctoniques ont développé différentes stratégies adaptatives pour faire face à ces déséquilibres.

Ces réponses physiologiques consistent à optimiser la croissance dans un environnement donné en modifiant le flux d'énergie entrant (ex : adaptation des systèmes photosynthétiques) et en adaptant la croissance à ce flux d'énergie. La photoadaptation permet de maximiser la croissance à faible irradiance, et à minimiser les dommages liés à la photooxydation dans des cas de forte intensité lumineuse, lorsque les nutriments sont limitants ou encore à faible température (Geider *et al.* 1998). Les mécanismes d'acclimatation sont nombreux et complexes et agissent dans des échelles de temps allant de la seconde à plusieurs jours. Ils consistent en des modifications de la physiologie des cellules, qui peuvent être transitoires, pour permettre aux cellules de supporter un déséquilibre passager, ou qui peuvent se maintenir dans le temps dans un régime dit « de croissance équilibrée ». Dunford and Falkowski (1997) ont montré que de nombreux processus adaptatifs étaient régulés par le niveau redox de la cellule (voir Chapitre 1). Les lipides sont aussi impliqués dans la réponse des algues aux changements des conditions de croissance.

2- La réponse lipidique aux contraintes du milieu : Rappel des résultats obtenus

Nous avons étudié dans cette thèse la composante lipidique de la réponse des organismes aux changements de l'environnement. Comme nous l'avons vu, les lipides englobent une grande quantité de composés qui ont des fonctions différentes dans la cellule. Nous nous sommes intéressés à deux classes de lipides qui correspondent à deux fonctions cellulaires importantes. Les TAG constituent, avec les sucres, une des principales formes de réserve énergétique de la cellule, et participent à la réponse aux contraintes extérieures en tant que « tampons énergétiques ». Les glycolipides, lipides des chloroplastes, participent à l'adaptation des systèmes photosynthétiques.

2.1 Les réserves énergétiques des algues

Nous avons étudié l'importance des lipides neutres et des sucres dans l'acclimatation des algues aux contraintes du milieu dans quatre cas particuliers. Nous avons d'abord comparé les effets de la **carence** en azote et de la **limitation** par l'azote en chimostat sur l'accumulation de sucres et de lipides neutres. Nous avons ensuite étudié l'influence des **cycles Jour/Nuit** en croissance non limitée par l'azote pour comprendre l'influence des réserves dans la croissance en cycle diurne. Finalement, nous nous sommes intéressés aux effets conjugués de la carence et des cycles diurnes sur l'accumulation des réserves énergétiques. Nos résultats ont souligné l'importance des lipides neutres et des sucres dans les processus d'adaptation, et précisé leur dynamique à la fois dans leur phase de stockage et dans leur phase de consommation.

2.1.1 Le stockage de réserves

A travers nos expériences, nous avons étudié le lien entre approvisionnement en azote et accumulation de réserves carbonées. Nous avons confirmé que la carence en azote entraînait bien une accumulation de lipides de réserve et de sucres chez *Isochrysis* sp., mais que cette accumulation n'était pas le résultat d'une synthèse de réserve accrue. Lorsqu'une carence en azote intervient, la synthèse des lipides neutres et des sucres diminue, mais relativement moins vite que celle du reste du carbone, ce qui provoque l'accumulation observée. Comme l'avaient suggéré Shifrin and Chisholm (1981), une grande partie de l'énergie et du carbone issus de la photosynthèse est, suite à une carence azotée, redirigée vers les sucres et les lipides qui « canalisent » cette énergie et protègent ainsi la cellule contre les effets de ce déséquilibre énergétique (surréduction de la chaîne de transfert des électrons, chocs oxydatifs avec synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène). Ce même rôle a été attribué par différents auteurs à l'excrétion de composés organiques en période de stress lumineux ou de carence nutritive (Hellebust 1965, Mykkestad 1999). Bien qu'extracellulaires, ces molécules peuvent être considérées comme des réserves énergétiques, car elles sont susceptibles d'être réassimilées par les algues.

Geider *et al.* (1998) ont suggéré que les réserves énergétiques des algues étaient accumulées lorsque la photosynthèse était en excès par rapport à l'assimilation de l'azote. Nous avons démontré que les dynamiques des sucres et des lipides neutres n'étaient pas toujours les mêmes (Chapitre 3 et 4).

Nous avons démontré que lorsque le taux de croissance est contrôlé par la disponibilité en azote, il existe effectivement une relation linéaire décroissante entre le quota en azote et le quota en **sucres** (Figure 2A, B), suggérant qu'à faible taux de croissance une partie accrue du carbone fixé est redirigée vers la synthèse de **sucres**.

Plus intéressant encore, cette relation entre les quotas d'azote et de sucres est également observée lorsque leur variation respective est induite par le cycle lumineux diurne, en l'absence de limitation nutritionnelle. Dans ces conditions, tout se passe comme si le processus d'assimilation d'azote était limité par un autre facteur que le substrat lui-même. Ces observations confirment celles de Clark *et al.* (2002) réalisées sur la diatomée *Thalassiosira weissflogii* qui ont montré que pendant le jour, les fortes lumières sont à l'origine d'un déséquilibre entre les métabolismes de l'azote et du carbone qui aboutit à une accumulation de réserves, ensuite consommées pour poursuivre l'assimilation des nitrates la nuit.

Pour ce qui concerne les lipides neutres, la relation négative entre leur quota et celui en azote a été observée en conditions de carence en azote et en cycles J/N, mais non en conditions de limitation azotée (Figure 2). Les lipides neutres sont uniquement accumulés transitoirement lors de déséquilibres énergétiques forts entre le flux d'énergie entrant et les possibilités de croissance (carence en azote, cycle J/N à forte lumière). En régime de croissance équilibrée, le quota en lipides neutres augmente avec la croissance, et est proportionnel au quota azoté (Figure 2E). Et finalement, une carence azotée intervenant en régime photopériodique ne provoque pas d'accumulation significative de lipides neutres.

Les expériences distinctes conduites en conditions soit de limitation soit de carence par l'azote ont permis de montrer des différences dans les cinétiques d'accumulation des sucres et des lipides de réserves selon que la croissance est respectivement équilibrée ou non équilibrée. Les lipides neutres et les sucres ont des dynamiques d'accumulation différentes, et jouent donc des rôles différents dans l'adaptation des microalgues aux changements du milieu. Dans la partie 4.1, nous discuterons du possible avantage sélectif que procure aux microalgues la faculté d'accumuler des lipides ou des sucres en fonction du milieu dans lequel elles évoluent.

2.1.2 La consommation des réserves

Nous avons aussi montré que les lipides neutres et les sucres sont activement re-consommés en sortie de carence azotée, ainsi que pendant la phase nocturne d'un cycle J/N. La réintroduction de nitrate après une carence azotée provoque un déséquilibre entre les nouvelles possibilités de croissance (nitrate abondant) et la capacité des cellules à capter l'énergie lumineuse qui est adaptée aux faibles croissances. La consommation des lipides neutres fournit probablement l'énergie et le carbone nécessaire à une reprise de la croissance, le temps que l'azote nouvellement disponible soit assimilé et investi dans la reconstruction du système photosynthétique. En cycles J/N, les réserves énergétiques sont largement consommées pendant la nuit, probablement pour fournir de l'énergie pour le métabolisme nocturne des algues (assimilation des nutriments, synthèse des protéines).

Les lipides neutres et les sucres constituent donc de véritables tampons énergétiques qui permettent aux cellules d'optimiser leur croissance dans un environnement variable.

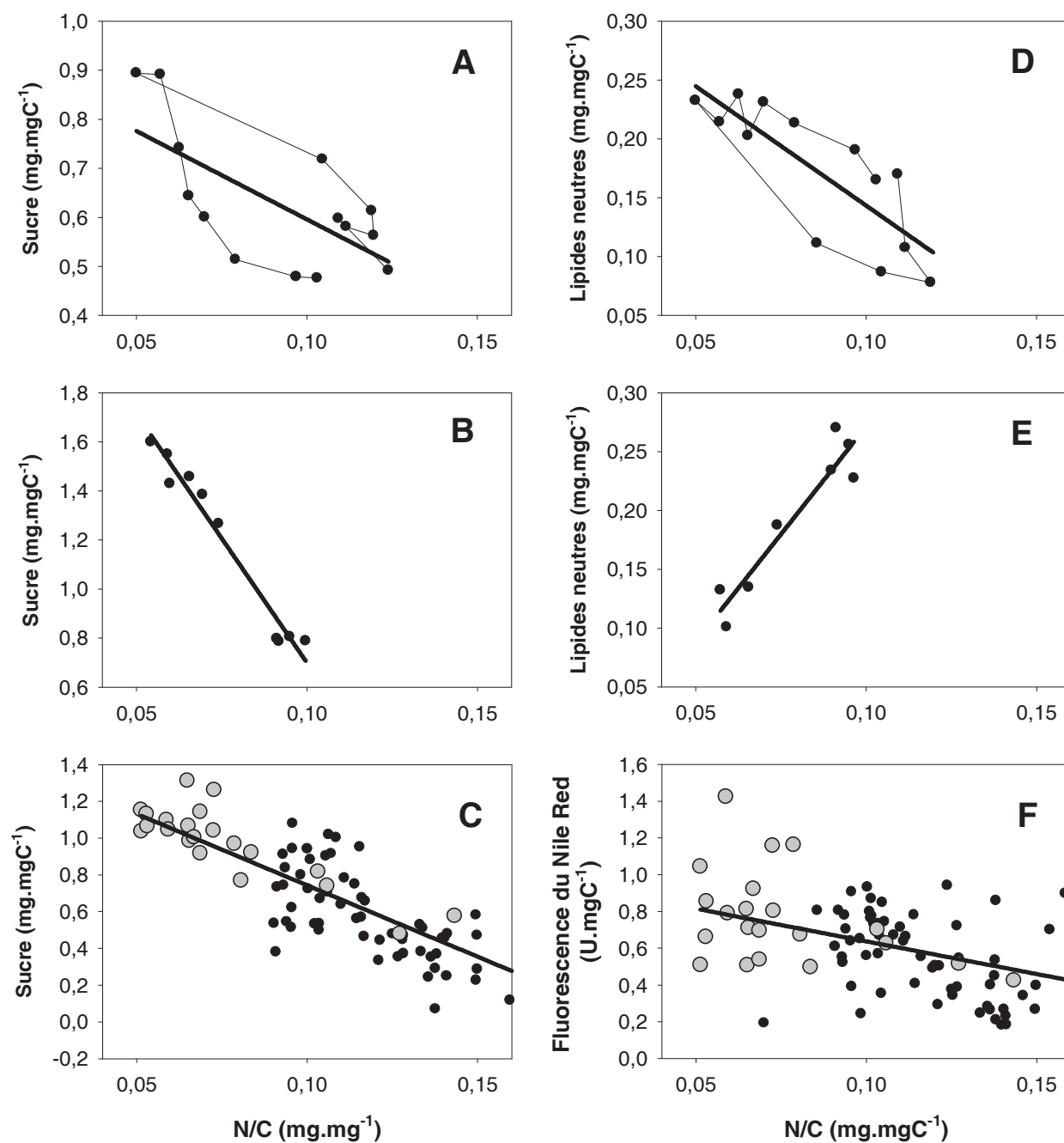


Figure 2 : Relations entre le quota en azote et le quota en sucres et en lipides neutres dans différentes conditions de croissance. A et D : Carence et levée de carence ; B et E : Limitation en régime équilibré ; C et F : cycle jour nuit non carencé (point noir) et carencé (point gris).

2.2 Les glycolipides

Pour ajuster leur approvisionnement en énergie aux conditions de croissance, les cellules phytoplanctoniques modifient en profondeur leur capacité photosynthétique (Falkowski *et al.* 1989, Herzig and Falkowski 1989, MacIntyre *et al.* 2002). Pour cela, elles modifient leur cortège pigmentaire (par exemple, changement du rapport Chl*a*/C) ainsi que la synthèse et l'activité de protéines impliquées dans les phases lumineuses et obscures de la photosynthèse. Nos travaux montrent que les lipides des chloroplastes sont aussi impliqués dans cette réponse (Chapitre 6). Les protéines photosynthétiques sont enchâssées dans des membranes lipidiques et interagissent avec celles-ci (Figure 3). Les changements des proportions de MGDG, DGDG et SQDG et du niveau d'insaturation de ces glycolipides modifient l'activité de ces protéines (Jones 2007). Nous avons montré que la composition en glycolipides est largement modifiée par les conditions de croissance, notamment pour accompagner les changements de la composition en protéines des membranes, mais probablement aussi pour moduler l'activité des protéines photosynthétiques.

Les lipides sont donc impliqués dans l'acclimatation des cellules aux changements de l'environnement en tant que **produits** de la photosynthèse (TAG) et en tant qu'**acteurs** de la photosynthèse (glycolipides).

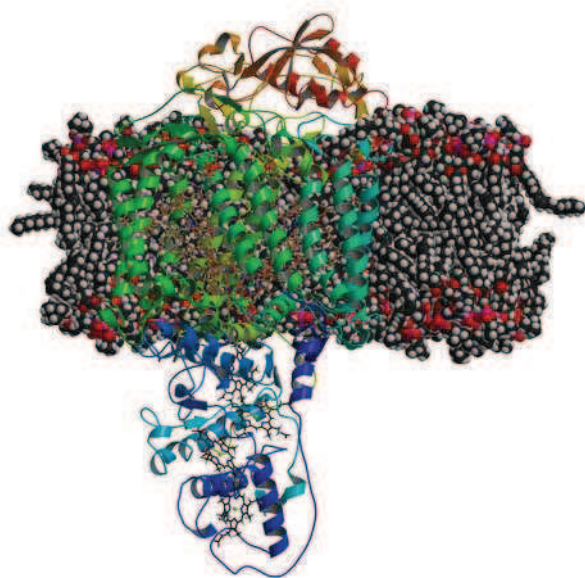


Figure 3 : Représentation schématique d'un centre réactionnel d'un photosystème enchâssé dans une membrane lipidique

3. Les algues pour produire du biocarburant

L'un des objectifs de ce travail était d'étudier la possibilité de faire produire par les cellules phytoplanctoniques de grande quantité d'huile en vue d'une utilisation biocarburant. Les différentes expériences réalisées apportent des informations importantes qui permettent d'optimiser la productivité et la qualité des huiles produites.

3.1 *Quota vs. Productivité*

La viabilité économique de la production de carburant par une culture d'algue dépend largement de sa **productivité en huile**. La **teneur (ou quota) en huile** peut être aussi un paramètre important dans les étapes de traitement de la biomasse. Notamment, de fortes teneurs en huiles améliorent l'efficacité d'extraction (Rodolfi *et al.* 2009). Notre premier objectif était donc de déterminer comment certaines conditions environnementales facilement maîtrisables pouvaient être utilisées pour optimiser la productivité et la teneur en huile. Nous avons élargi notre étude aux sucres pour deux raisons : ils constituent un coproduit dont la production peut être intéressante, et en tant que réserves énergétiques, ils entrent en compétition avec les triglycérides pour la production de biocarburant.

Nous avons montré que les différents types de limitation azotée exerçaient des influences différentes sur la productivité et la teneur des réserves (lipides neutres et sucres). La figure 4A illustre bien cette différence entre productivité et quota : il existe une relation linéaire décroissante entre le quota et la productivité en sucres pendant une carence en azote. La carence augmente fortement le quota en sucres mais diminue fortement aussi la productivité en sucres. Par ailleurs, nous avons pu démontrer que la carence azotée permettait d'augmenter le quota en lipides neutres mais aussi, transitoirement, la productivité en lipides neutres. Productivité et quota en lipides neutres ne sont donc pas antagonistes (Figure 4B).

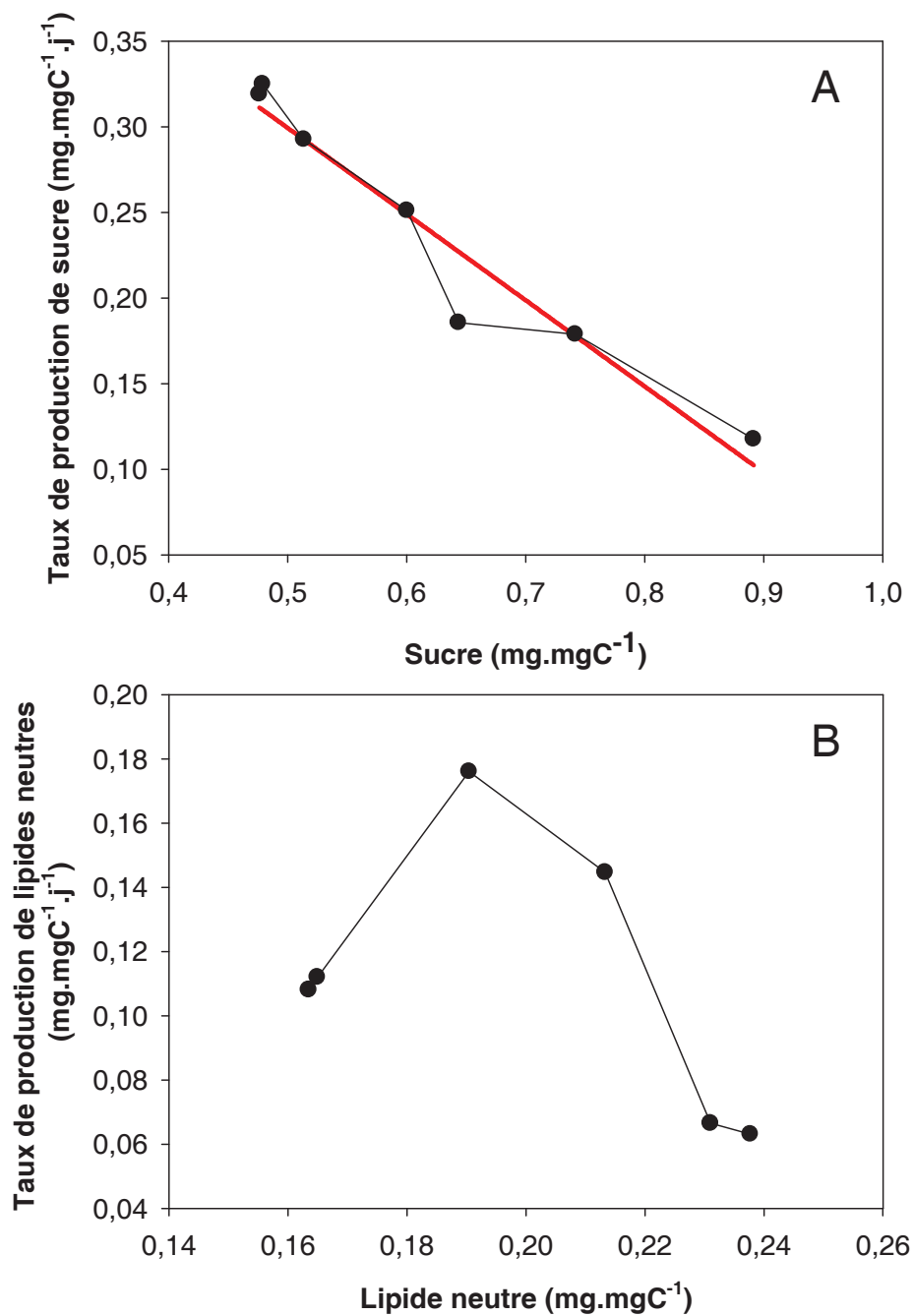


Figure 4 : Relation entre le quota en sucres et le taux de production des sucres (A) et entre le quota en lipides neutres et le taux de production des lipides neutres (B) d'une culture d'*Isochrysis* sp. au cours d'une carence en azote.

La limitation azotée en croissance équilibrée ne permet pas d'augmenter ni la productivité ni le quota en lipides neutres, quel que soit le degré de limitation. Par contre, elle permet d'augmenter le quota en sucres et, à certains niveaux de limitation, sa productivité.

Ces résultats permettent de proposer des options de solutions techniques pour la production de biofuel par les algues. Chez *Isochrysis* sp., la possibilité de jouer sur la disponibilité de l'azote en **culture continue** ne permet pas d'augmenter la productivité des lipides neutres. Il semble que, pour cette espèce, une stratégie impliquant deux étapes soit plus adaptée : une première phase de croissance non limitée pour produire rapidement de la biomasse, suivie d'une seconde phase de carence azotée qui permet essentiellement d'enrichir la biomasse produite en huile. **Les sucres** ont des dynamiques d'accumulation différentes vis-à-vis des contraintes environnementales, les stratégies optimales pour leur production sont donc différentes. La production de sucres peut être optimisée **en chémostat** avec un taux de dilution de 0.67 j^{-1} .

Il faut donc adapter le procédé de production aux caractéristiques d'accumulation des molécules que l'on veut produire. Ces caractéristiques d'accumulation étant spécifiques de l'espèce d'algue considérée (Shifrin and Chisholm 1981), il est nécessaire d'adapter le procédé de production à l'espèce utilisée ou inversement. Les espèces d'algues dont la productivité en huile est augmentée par la limitation azotée en régime équilibré pourront être utilisées pour produire en continu de l'huile.

Finalement, le choix de l'espèce d'algue à utiliser pour produire du biocarburant dépend du procédé de production utilisé (continu, discret) et des conditions environnementales dans lesquelles on va les produire (intensité lumineuse, température).

3.2 Le cycle lumineux diurne : un paramètre crucial

Pour des raisons économiques et énergétiques, la production de biofuel par les algues doit utiliser l'éclairement naturel, lequel est périodique. Nos expériences en cycle diurne apportent de nouvelles informations pour les protocoles de procédés de production. Tout d'abord, nous avons montré que, lorsque l'intensité lumineuse au cours de la journée est élevée, les lipides neutres et les sucres activement accumulés pendant la phase claire, sont re-consommés pendant la nuit. Ces résultats permettent de choisir le meilleur moment pour la récolte : prélever le soir pour optimiser la teneur en huile. Ensuite, nous avons montré que ni le quota en huile, ni la productivité en huile n'étaient améliorés par une carence azotée sous éclairement photopériodique.

La production optimale d'huile par *Isochrysis* sp. sous éclairement naturel est donc obtenue en conditions de croissance non limitée par l'azote, et en prélevant la biomasse en fin de journée.

3.3 La qualité des huiles produites

Pour être conformes aux normes des motoristes, les biofuels doivent respecter des standards de qualité (Knothe 2005). Comme nous l'avons vu, la qualité d'un biofuel dépend essentiellement de sa composition en acides gras (Knothe 2005). Les huiles des microalgues sont caractérisées par des teneurs en acides gras polyinsaturés supérieures à celles des autres huiles végétales. De par le fort taux d'insaturation de leurs acides gras, les huiles d'algues ne respectent pas certaines des normes imposées aux biocarburants (Chapitre 4). Pourtant ceci ne semble pas constituer une limitation réelle pour l'utilisation de l'huile des microalgues en tant que biodiesel.

Tout d'abord nous avons vu que pour certaines espèces d'algues, la carence en azote modifiait de manière importante le taux d'insaturation de leurs huiles. Cette méthode pourrait être utilisée pour manipuler la composition et les propriétés des huiles afin de les rendre acceptables. De plus, il est possible de réaliser une hydrogénation catalytique des huiles (méthode utilisée couramment dans l'industrie pour fabriquer de la margarine à partir d'huile végétale) qui diminue leur insaturation (Chisti 2007). Pour finir, on peut aussi imaginer que de nouvelles normes soient adaptées à ces nouvelles huiles. Les normes actuelles ont été établies en fonction des moteurs à explosion existants qui ne sont pas adaptés à la plupart des huiles végétales produites actuellement. Un changement à moyen terme des carburants utilisés entraînera probablement des modifications des caractéristiques des moteurs et ainsi, des changements des critères pour l'acceptabilité des huiles.

4. Perspectives : La capacité à stocker des lipides : un avantage compétitif ?

4.1 Influence des lipides sur la croissance

Tout au long de ce travail, nous avons montré comment la composition lipidique des algues pouvait être modifiée par les conditions de croissance, mais beaucoup reste à faire pour comprendre comment la croissance est modifiée par la composition lipidique. Par extension, on peut se demander quel est l'avantage compétitif que procure cette capacité à stocker des lipides.

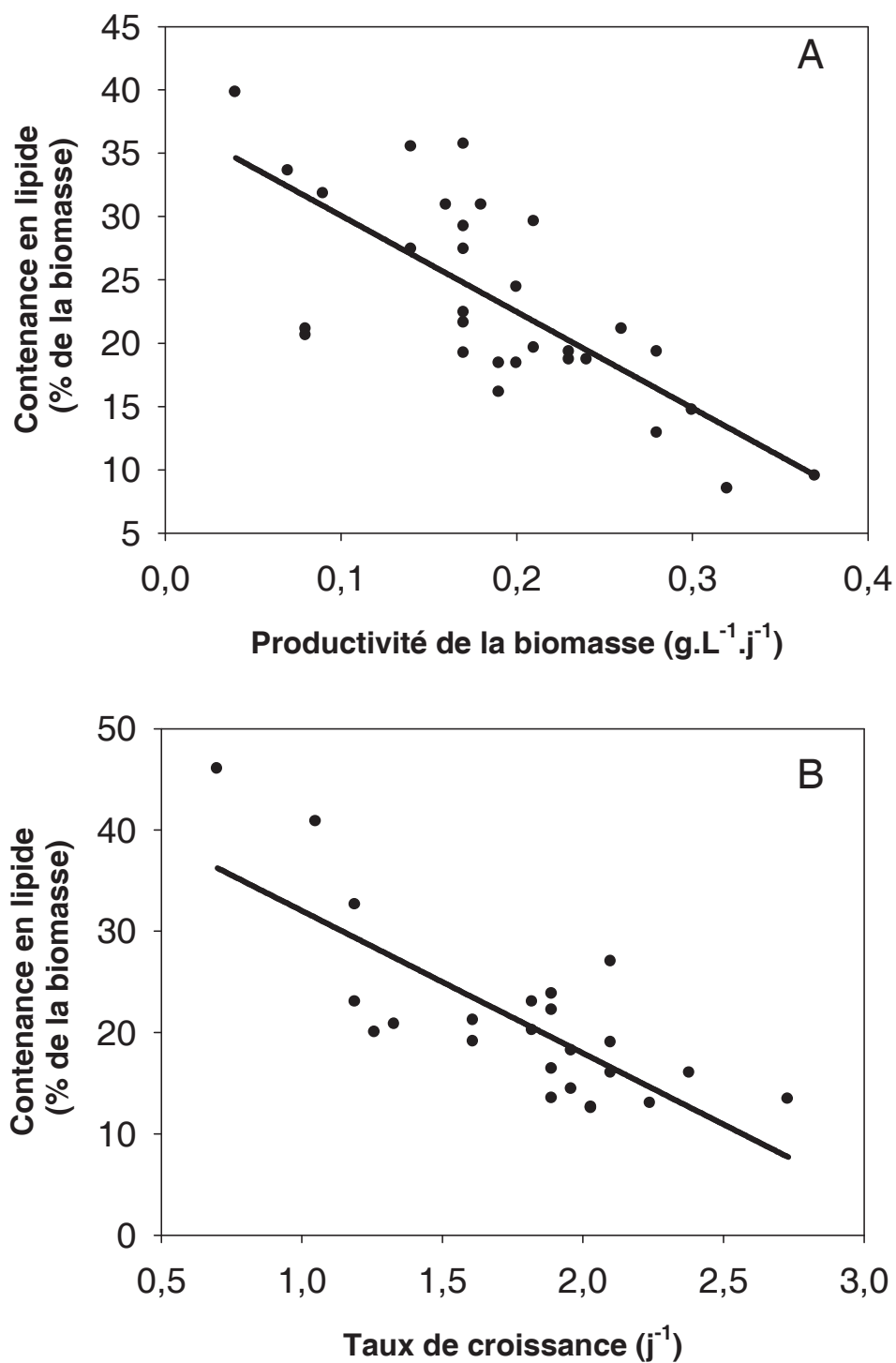


Figure 5 : A. Relation entre la productivité de la biomasse en régime non limité et la teneur en lipides totaux pour 30 espèces de phytoplancton. B. Relation entre le taux de croissance en régime non limité et la contenance en lipides pour 24 espèces de phytoplancton. Les données de A et B sont extraites de Rodolfi *et al.* (2008) et Shifrin and Chisholm (1981) respectivement.

4.1.1 Dans un environnement non limité, en lumière continue

Nous avons montré qu'en lumière continue, une carence en azote provoque, chez une espèce donnée, une accumulation de lipides, simultanément à un ralentissement de sa croissance. L'analyse de certaines données bibliographiques (Shifrin and Chisholm 1981, Rodolfi *et al.* 2009) montre que cette relation existe également au niveau interspécifique : les espèces qui, à conditions égales, ont les taux de croissance les plus élevés, ont les teneurs en lipides les plus faibles (Figure 5A et 5B). Ces données ont été obtenues en conditions de croissance non limitée par les nutriments, et en lumière continue. Dans ces conditions, les espèces qui contiennent beaucoup de lipides ont, en moyenne, des taux de croissance plus faibles. Ainsi, **dans un environnement non limité par les nutriments et en lumière continue**, la capacité à stocker des lipides ne semble donc pas constituer un avantage compétitif.

4.1.2 En régime nutritif variable

Nous avons montré qu'en sortie de carence azotée, les lipides neutres étaient mobilisés, probablement pour alimenter la reprise de la croissance. Nous avons aussi observé, pendant cette période, des taux d'assimilation d'azote supérieurs aux taux maximum observés en croissance non limitée (données non présentées). On peut donc faire l'hypothèse que les espèces qui sont capables d'accumuler significativement des lipides sont avantagées **dans des régimes nutritifs variables**.

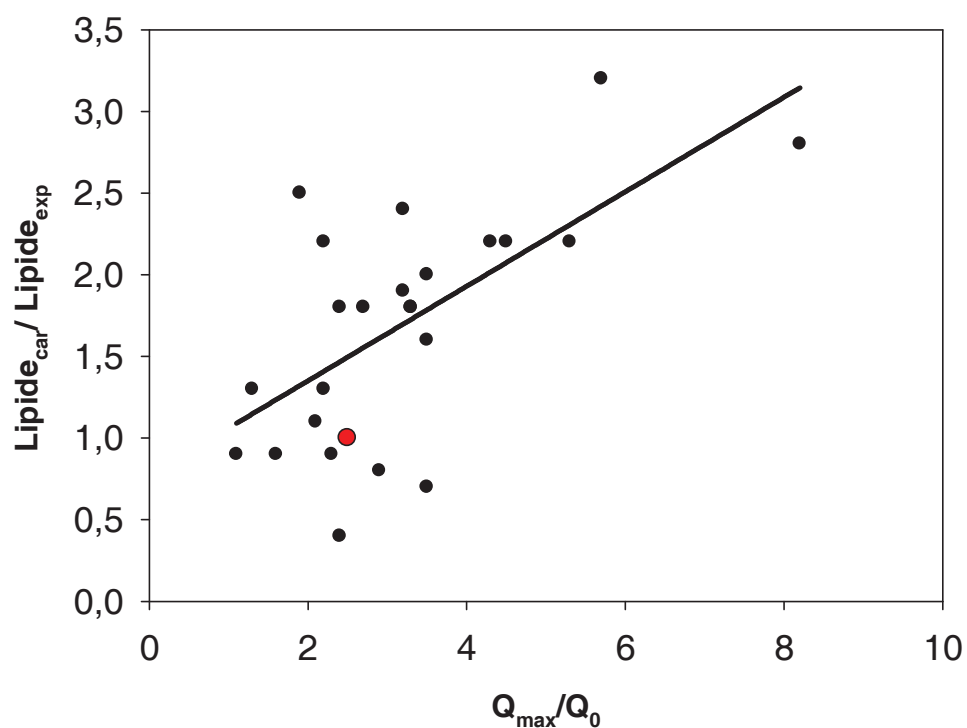


Figure 6 : Relation entre la capacité à stocker de l'azote et la capacité à accumuler des lipides en carence pour 24 espèces de phytoplancton (chaque point correspond à une espèce de phytoplancton). La capacité à accumuler des lipides totaux en carence est mesurée par le rapport des quotas mesurés après 7 ou 9 jours de carence ($\text{Lipide}_{\text{car}}$) et en croissance non limitée ($\text{Lipide}_{\text{exp}}$). La capacité à accumuler de l'azote est mesurée par le rapport des quotas mesuré en croissance non limitée (Q_{max}) et après 7 ou 9 jours de carence (Q_0). Les données utilisées sont extraites de Shifrin et Chisholm (1981). Le point rouge correspond aux caractéristiques d'*Isochrysis* sp. mesurées dans nos expériences de carence.

Pour creuser cette hypothèse, nous avons effectué une nouvelle analyse des données de Shifrin and Chisholm (1981), qui nous montre que la capacité des espèces à accumuler des lipides en carence azotée est proportionnelle à leur capacité à constituer des réserves d'azote (Figure 6). Or, Collos (1986), dans son travail sur les découplages temporels entre absorption des nutriments et croissance, a aussi montré que les espèces capables de stocker de grandes quantités de nutriment sont également celles qui présentent les plus longues phases de latence en sortie de carence nutritive. Le rapprochement de ces deux études tend donc à montrer que les espèces qui accumulent le plus de lipides en carence azotée sont les plus lentes à recouvrer leur croissance lorsque les nutriments sont à nouveau disponibles, ce qui est contradictoire avec nos précédentes hypothèses faites sur le rôle joué par les lipides chez des cellules en sortie de carence. Cette contradiction peut s'expliquer par le fait que les espèces qui n'accumulent pas de lipides en carence sont capables d'accumuler de plus grandes quantités de sucres, lesquels pourraient être utilisés plus rapidement que les lipides. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Finalement, ce n'est pas en **sortie de carence** que la capacité à accumuler des lipides est un atout pour une espèce.

Nous avons aussi émis l'hypothèse que, lors de **l'entrée en carence**, les lipides neutres pouvaient avoir un rôle dans la canalisation de l'énergie issue de la photosynthèse. Ce processus permettrait de protéger la cellule contre de possibles stress oxydatifs qui sont très coûteux en énergie (réparation des photosystèmes, gestion des dérivés réactifs de l'oxygène) et qui peuvent entraîner la mort cellulaire. Une fois de plus, des données supplémentaires sont nécessaires pour approfondir cette hypothèse (voir paragraphe 4.1.4).

4.1.3 En cycle Jour/Nuit

Les différentes données de la littérature ont été acquises en régime de lumière continue et ne reflètent donc pas le rôle que peuvent jouer les lipides dans la croissance en cycle Jour/Nuit. On peut supposer que, dans le milieu naturel, les cellules qui arrivent à stocker d'importantes quantités d'énergie sous forme de lipides pendant la journée seront capables de les utiliser la nuit afin d'assurer la réalisation de processus métaboliques nocturnes. De nombreuses espèces présentent une synthèse nocturne de protéines qui nécessite un niveau d'énergie que seules les réserves de lipides et de sucres accumulées pendant la journée sont susceptibles de fournir. De plus, Clark *et al.* (2002) ont suggéré que certaines espèces de diatomées, de par leur capacité à accumuler de l'énergie pendant le jour, pouvaient continuer à absorber des quantités significatives de nutriments pendant la nuit. C'est peut-être dans ces conditions de croissance que la capacité à accumuler des lipides devient un avantage sélectif.

Brand et Guillard (1981) ainsi que Price *et al.* (1998) ont montré que les espèces phytoplanctoniques côtières ont des taux de croissance plus importants en lumière continue, par opposition aux espèces plus océaniques qui croissent plus rapidement en cycle Jour/Nuit. Cette opposition d'habitats (côtier/océanique) explique beaucoup plus les différences que l'origine phylogénétique des algues. L'hypothèse de Brand et Guillard (1981) est que les espèces côtières vivent dans un environnement très turbulent avec des variations importantes de l'intensité lumineuse au cours de la journée, alors que les espèces océaniques font l'expérience d'un régime lumineux essentiellement dominé par le cycle Jour/Nuit. Un tel régime lumineux aurait ainsi permis au phytoplancton de développer des mécanismes d'adaptation liée à un régime lumineux périodique. Les espèces côtières seraient plus adaptées à des régimes lumineux fluctuants aux fréquences élevées et imprédictibles. La capacité à

accumuler des lipides pendant la journée pourrait être l'une des adaptations des espèces océaniques qui leur permet de croître plus vite en cycle J/N.

4.1.4 Des expériences à réaliser

Pour tester nos hypothèses sur le rôle des lipides dans la croissance des algues, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de compétition entre espèces avec peu ou beaucoup de lipides de réserves. En les soumettant à des cycles lumineux diurnes et des cycles de carences et de réapprovisionnements en NO_3 à différentes fréquences, on pourrait déterminer dans quelles conditions environnementales la capacité à accumuler des lipides de réserves peut constituer un avantage sélectif.

4.2 Rôle des réserves dans la flottabilité

La flottabilité du phytoplancton marin a reçu une grande attention ces dernières années en raison de l'intérêt porté à la sédimentation et l'export de la matière organique en eau profonde (Jahnke 1990). Nous avons vu que les conditions environnementales modifient de manière importante la composition biochimique des algues, lesquelles entraînent des changements de densité qui peuvent changer leur flottabilité. Pour explorer le possible rôle de ballast des réserves, nous avons mesuré la vitesse de chute d'*Isochrysis* sp. en carence azotée et en cycle Jour/Nuit.

La loi de Stokes est couramment utilisée pour décrire la vitesse de chute des cellules de phytoplancton dans la colonne d'eau (Richardson and Cullen 1995) :

$$V = \frac{2}{9} \frac{gr^2(\rho - \rho')}{\mu\Phi_r}$$

Avec V : vitesse de chute (m.s⁻¹) ; g : accélération liée à la gravité (m.s⁻²) ; r : rayon de la cellule (m) ; ρ : densité intracellulaire (kg.m⁻³) ; μ : Viscosité dynamique de l'eau (kg.m⁻¹.s⁻¹) ; ρ' : densité de l'eau de mer (kg.m⁻³) ; Φ_r : coefficient de résistance de la forme de la cellule.

Si l'on considère en première approximation que, parmi ces paramètres, seuls la densité et le rayon des algues sont variables, on peut comparer les vitesses de chute de cellules phytoplanctoniques de tailles et de densités différentes :

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{r_1^2 \times (\rho_1 - \rho')}{r_2^2 \times (\rho_2 - \rho')}$$

On peut ainsi comparer les vitesses de chute des cellules de phytoplancton d'*Isochrysis* sp. en cycle J/N et en carence (Figure 7) calculées à partir de sa composition en sucres, lipides et

protéines. Les sucres sont des molécules très denses ($\rho \approx 1600 \text{ kg.m}^{-3} > \rho'$) qui diminuent la flottabilité des cellules alors que les lipides ont plutôt tendance à l'augmenter ($\rho \approx 800 \text{ kg.m}^{-3} < \rho'$). Dans les conditions de croissances étudiées, les modifications des teneurs en sucres sont responsables de l'essentiel des modifications de flottabilité, car leur densité spécifique est celle qui s'éloigne du milieu de culture ($\rho' \approx 1038 \text{ kg.m}^{-3}$).

Pendant la phase claire du cycle J/N, la vitesse de chute des cellules est multipliée par deux (les sucres sont accumulés, la taille des cellules augmente). Pendant la phase nocturne, les sucres sont massivement consommés ce qui entraîne une augmentation de la flottabilité et une diminution des vitesses de chute (Figure 7A). Ces résultats montrent que les cellules possèdent une flottabilité maximale le matin, et minimale le soir. Il est possible que ces modifications favorisent le maintien des cellules dans la couche de mélange pendant le jour, et au contraire favorisent leur sédimentation vers la zone riche en nutriments pendant la nuit (lorsque la photosynthèse n'est plus possible).

Suivant ce schéma, une carence en azote pourrait provoquer, quant à elle, une augmentation de la vitesse de chute des cellules phytoplanctoniques en diminuant leur flottabilité. Lorsque la carence est levée, la flottabilité des cellules est rétablie (Figure 7B).

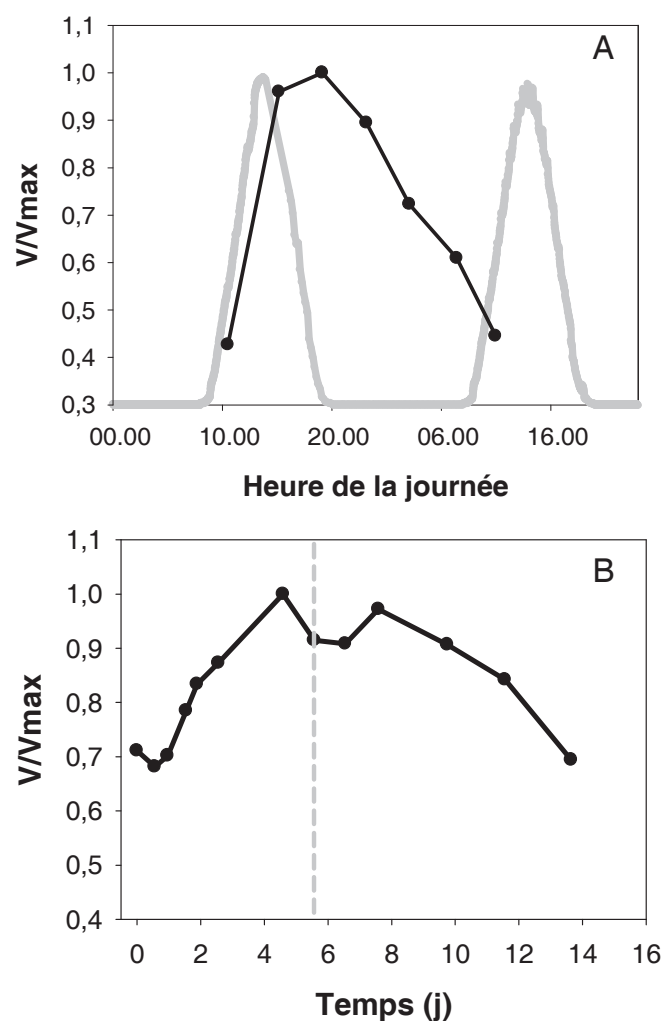


Figure 7 : Evolution du rapport V/V_{max} au cours d'un cycle J/N (A) et pendant une mise en carence et sa levée (B). La levée de la carence est symbolisée par la ligne pointillée grise. Les densités des algues sont calculées à partir de leurs concentrations en sucres, lipides et protéines auxquelles on a attribué des densités moyennes de 1600, 800 et 1350 kg.L⁻¹ respectivement. La vitesse de chute est normalisée par V_{max} , la vitesse de chute maximale calculée au cours de l'expérience.

Ces modifications de flottabilité des cellules induites par les conditions de croissance à travers les modifications de leur composition biochimique pourraient avoir d'importantes conséquences écologiques. Le modèle de Lande et Wood (1987) montre que, dans un environnement turbulent, les cellules qui ont des vitesses de chute plus faibles passent statistiquement plus de temps dans la couche de mélange de surface. La relation entre flottabilité et statut azoté que nous avons proposée serait donc susceptible de permettre aux cellules de se maintenir plus longtemps dans des eaux peu profondes (pauvres en nutriments, bien éclairées) lorsqu'elles ne sont pas limitées par l'azote, et de couler jusqu'à la nutricline (faible lumière, riche en nutriments) lorsqu'elles deviennent carencées. Cette alternance d'expositions favorables aux nutriments et à la lumière permet d'optimiser la croissance en découplant temporellement et spatialement l'assimilation de carbone et d'azote. Richardson et Cullen (1995) ont identifié ces mécanismes sous la dénomination d'"assimilation de nutriment assisté par la flottabilité".

Ces conclusions, qui sont probablement applicables à de nombreuses autres espèces de phytoplancton, doivent cependant être nuancées pour *Isochrysis* sp. qui, flagellé, peut se déplacer dans la colonne d'eau, et échapper au seul processus de sédimentation. Cependant, nous avons observé que, carencées en nitrate, les cellules d'*Isochrysis* sp. présentent une motilité fortement réduite.

VIII. Bibliographie

- Ackman, R.G., Ratnayake, W.M.N. (1989) Lipids analyses: Part I: Properties of Fats, oils and Lipids: recovery and basic compositional studies with gas-liquid chromatography and thin layer chromatography. The role of fats in human nutrition, London
- Alberghina, L., Rossi, R.L., Querin, L., Wanke, V., Vanoni, M. (2004) A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol* 167:433-443
- Allen, C.A.W., Watts, K.C., Ackman, R.G., Pegg, M.J. (1999) Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. *Fuel* 78:1319-1326
- Alonzo, F., Mayzaud, P. (1998) Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. *Marine chemistry* 67:289-301
- Awai, K., Marechal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K.-i., Ohta, H., Joyard, J. (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10960-10965
- Bamgboye, A.I., Hansen, A.C.G. (2008) Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition. *Int Agrophysics* 22:21-29
- Behrenfeld, M., J., Prasil, O., Kolber, Z., S., Babin, M., Falkowski, P.G., G. (1998) Compensatory changes in Photosystem II electron turnover rates protect photosynthesis from photoinhibition. *Photosynth Res* 58:259-268
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003) Biochemistry, Vol. W.H. Freeman and company, New York
- Bernard, O., Gouzé, J. (2002) Global qualitative description of a class of nonlinear dynamical systems. *Artificial Intelligence* 136:29-59
- Bernard, O., Malara, G., Sciandra, A. (1996) The effects of a controlled fluctuating nutrient environment on continuous cultures of phytoplankton monitored by a computer. *J Exp Mar Biol Ecol* 197:263-278
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Brand, L.E., Guillard, R.R.L. (1981) The Effects Of Continuous Light And Light-Intensity On The Reproduction Rates Of 22 Species Of Marine-Phytoplankton. *J Exp Mar Biol Ecol* 50:119-132
- Bruyant, F., Babin, M., Genty, B., Prasil, O., Behrenfeld, M.J., Claustre, H., Bricaud, A., Garczarek, L., Holtzendorff, J., Koblizek, M., Dousova, H., Partensky, F. (2005) Diel Variations in the Photosynthetic Parameters of *Prochlorococcus* Strain PCC 9511: Combined Effects of Light and Cell Cycle. *Limnol Oceanogr* 50:850-863
- Bruyant, F., Babin, M., Sciandra, A., Marie, D., Genty, B., Claustre, H., Blanchot, J., Bricaud, A., Rippka, R., Boulben, S., Partensky, F. (2001) An axenic turbidostat of *Prochlorococcus* strain PCC 9511 with a simulator of natural light regimes. *J Appl Phycol* 13:135-142
- Buchanan, R.E. (1918) Life Phases in a Bacterial Culture. *The Journal of Infectious Diseases* 23:109-125
- Caperon, J. (1968) Population Growth Response of *Isochrysis Galbana* to Nitrate Variation at Limiting Concentrations. *Ecology* 49:866-872

- Chisholm, S.W., Costello, J.C. (1980) Influence of environmental factors and population composition on the timing of cell division in *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) grown on light/dark cycles. *J Phycol* 16:375-383
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294
- Claquin, P., Kromkamp, J., Martin-Jezequel, V. (2004) Relationship between photosynthetic metabolism and cell cycle in a synchronized culture of the marine alga *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *Eur J Phycol* 39:33-41
- Claquin, P., Martin-Jézéquel, V., Kromkamp, J.C., Veldhuis, M.J.W., Kraay, G., W. (2002) Uncoupling of silicon compared with carbon and nitrogen metabolisms and the role of the cell cycle in continuous cultures of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) under light, nitrogen, and phosphorus control. *J Phycol* 38:922-930
- Clark, D.R., Flynn, K.J., Owens, N.J.P. (2002) The large capacity for dark nitrate-assimilation in diatoms may overcome nitrate limitation of growth. *New Phytol* 155:101-108
- Coleman, R.A., Lee, D.P. (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43:134-176
- Collos, Y. (1986) Time-lag algal growth dynamics: biological constraints on primary production in aquatic environments. *Mar Ecol Prog Ser* 33:193-206
- Cooksey, K.E., Guckerta, J.B., Williams, S.A., Callis, P.R. (1987) Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile red. *Journal of Microbiological Methods* 6:333-345
- Cuhel, R.L., Ortner, P.B., Lean, D.R.S. (1984) Night Synthesis of Protein by Algae. *Limnol Oceanogr* 29:731-744
- De Kruljff, B. (1997) Lipids beyond the bilayer. *Nature* 386:129-130
- Doran, E., Cattolico, R.A. (1997) Photoregulation of Chloroplast Gene Transcription in the Chromophytic Alga *Heterosigma carterae*. *Plant Physiol* 115:773-781
- Dörmann, P., Benning, C. (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* 7:112-118
- Droop, M.R. (1968) Vitamin B12 and marine ecology. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 48:689-733
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Durnford, D.G., Falkowski, P.G. (1997) Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynth Res* 53:229-241
- Elsay, D., Jameson, D., Raleigh, B., Cooney, M.J.G. (2007) Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods* 68:639-642
- Eltgroth, M.L., Watwood, R.L., Wolfe, G.V. (2005) Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*. *J Phycol* 41:1000-1009
- Fabregas, J., al. (2002) Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light: dark cycle. *Biotechnology Letters* 24:1699-1703
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Ferreira, M., Otero, A. (2002) Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light: dark cycle. *Biotechnology Letters* 24:1699-1703
- Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo-Vega, B.O., Tobar, J.L., Otero, A. (1995) Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:287-292

- Falkowski, P.G., Sukenik, A., Herzig, R. (1989) Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *J Phycol* 25:471-478
- Flynn, K.J., Garrido, J.L., Zapata, M., Öpik, H., Hipkin, C.R. (1992) Changes in fatty acids, amino acids and carbon/nitrogen biomass during nitrogen starvation of ammonium and nitrate-grown *Isochrysis galbana*. *J Appl Phycol* 4:95-104
- Flynn, K.J., Zapata, M., Garrido, J.L., Opik, H., Hipkin, C.R. (1993) Changes in carbon and nitrogen physiology during ammonium and nitrate nutrition and nitrogen starvation in *Isochrysis galbana*. *Eur J Phycol* 28:47-52
- Foy, R.H., Smith, R.V. (1980) The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. *British Phycological Journal* 15:139 - 150
- Geider, R.J., La Roche, J., Greene, R.M., Olaizola, M (1993) Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J Phycol* 29:755-766
- Geider, R.J., MacIntyre, H.L., Kana, T.M. (1998) A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol Oceanogr* 43:679-694
- Geider, R.J., Osborne, B.A. (1989) Respiration and Microalgal Growth: A Review of the Quantitative Relationship between Dark Respiration and Growth. *New Phytol* 112:327-341
- Gillard, J., Devos, V., Huysman, M.J.J., De Veylder, L., D'Hondt, S., Martens, C., Vanormelingen, P., Vannerum, K., Sabbe, K., Chepurinov, V.A., Inze, D., Vuylsteke, M., Vyverman, W. (2008) Physiological and Transcriptomic Evidence for a Close Coupling between Chloroplast Ontogeny and Cell Cycle Progression in the Pennate Diatom *Seminavis robusta*. *Plant Physiol* 148:1394-1411
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. (1992) Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to low-temperature photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9959-9963
- Gordillo, F.J.L., Jimenez, C., Chavarria, J., Niell, F.X. (2001) Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis*. *Photosynth Res* 68:225-235
- Goss, R., Wilhelm, C. (2010) Lipids in algae, lichens and mosses. In: Wada H, Murata N (eds) *Lipids in photosynthesis - Essential and regulatory functions*. Springer, Dordrecht, The Netherlands., p 117-137
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D. (1985) Nile red - A Selective Fluorescent Stain For Intracellular Lipid Droplets. *J Cell Biol* 100:965-973
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. (2008) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21:493-507
- Grobbelaar, J.U., Soeder, C.J. (1985) Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. *J Plankton Res* 7:497-506
- Guillard, R.R.L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: (Eds) WLSaMHC (ed) *Culture of invertebrate animals*, N.Y., p 29-66
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 45:160-186
- Hagiwara, S., Bolige, A., Zhang, Y., Takahashi, M., Yamagishi, A., Goto, K. (2002) Circadian Gating of Photoinduction of Commitment to Cell-cycle Transitions in Relation to Photoperiodic Control of Cell Reproduction in *Euglena*. *Photochemistry and Photobiology* 76:105-115
- Halsey, K.H., Milligan, A.J., Behrenfeld, M.J. (2010) Physiological optimization underlies growth rate-independent chlorophyll-specific gross and net primary production. *Photosynth Res* 103:125-137

- Handa, N. (1969) Carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum*. Mar Biol 4:208-214
- Harding, L.W., Meeson, B.W., Tyler, M.A. (1983) Photoadaptation and diel periodicity of photosynthesis in the dinoflagellate *Prorocentrum mariae-lebouriae*. Mar Ecol Prog Ser 13:73-85
- Harrison, P.J., Thompson, P.A., Calderwood, G.S. (1990) Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J Appl Phycol 2:45-56
- Harwood, J. (1996) Recent advances in the biosynthesis of plant fatty-acids. Biochim Biophys Acta 301:7
- Hellebust, J.A. (1965) Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. Limnol Oceanogr 10:192-206
- Herzig, R., Falkowski, P.G. (1989) Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. J Phycol 25:462-471
- Hildebrand, M., Dalhin, K. (2000) Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): mRNA levels controlled by nitrogen source and by cell cycle. J Phycol 36:702-713
- Holzl, G., Witt, S., Kelly, A.A., Zahringer, U., Warnecke, D., Dormann, P., Heinz, E. (2006) Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. PNAS 103:7512-7517
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008) Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances. Plant J 54:621-639
- Huntley, M., Redalje, D.G. (2007) CO₂ Mitigation et Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 12:573-608
- Jahnke, R.A. (1990) Ocean flux studies: A status report. Reviews of geophysics 28:381-398
- Jannasch, H.W. (1967) Growth of Marine Bacteria at Limiting Concentrations of Organic Carbon in Seawater. Limnol Oceanogr 12:264-271
- Jones, M.R. (2007) Lipids in photosynthetic reaction centers: Structural roles and functional holes. Prog Lipid Res 46:56-87
- Joseph, J.D. (1974) Identification Of A New Omega-3 Fatty-Acid In Cultured, Marine Dinoflagellates. J Am Oil Chem Soc 51:A515-A515
- Jouhet, J., Maréchal, E., Block, M.A. (2007) Glycerolipid transfer for the building of membrane in plant cells. Prog Lipid Res 46:37-55
- Kaftan, D., Meszaros, T., Whitmarsh, J., Nedbal, L. (1999) Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*. Plant Physiol 120:433-442
- Kang, L.K., Hwang, S.P.L., Lin, H.J., Chen, P.C., Chang, J. (2009) Establishment Of Minimal And Maximal Transcript Levels For Nitrate Transporter Genes For Detecting Nitrogen Deficiency In The Marine Phytoplankton *Isochrysis Galbana* (Prymnesiophyceae) And *Thalassiosira Pseudonana* (Bacillariophyceae). J Phycol 45:864-872
- Kates, M. (1970) Plant phospholipids and glycolipids. Adv lip Res 8:225-265
- Khotimchenko, S.V., Yakovleva, I.M. (2005) Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. Phytochemistry 66:73-79
- Khozin-Goldberg, I., Bigogno, C., Shrestha, P., Cohen, Z. (2002) Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae). J Phycol 38:991-994
- Khozin-Goldberg, I., Shrestha, P., Cohen, Z. (2005) Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. Biochim Biophys Acta 1738:63-71

- Khozin-Goldberg, I., Yu, H.Z., Adlerstein, D., Didi-Cohen, S., Heimer, Y.M., Cohen, Z. (2000) Triacylglycerols of the red microalga *Porphyridium cruentum* can contribute to the biosynthesis of eukaryotic galactolipids. *Lipids* 35:881-889
- Kis, M., Zsiros, O., Farkas, T., Wada, H., Nagy, F., Gombos, Z. (1998) Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4209-4214
- Klyachko-Gurvich, G.L. (1999) Desaturation of fatty acids as an adaptative response to shifts in light intensity. *Physiol Plant* 107:240-249
- Knothe, G. (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel processing technology* 86:1059-1070
- Koo, J.K.K., Ohlrogge, J.B., Pollard, M. (2004) On the export of fatty acids from Chloroplast. *J Biol Chem* 279:16101-16110
- Kromkamp, J.C., Claquin, P. (2006) Role of cell cycle in the metabolism of marine microalgae. *Algal cultures analogues of blooms and applications* 1:385-406
- Kwok, A.C.M., Wong, J.T.Y. (2005) Lipid Biosynthesis and its Coordination with Cell Cycle Progression. *Plant Cell Physiol* 46:1973-1986
- Lacour, T., Sciandra, A., Gelay, A., Mayzaud, P., Bernard, O. (submitted a) Neutral lipid and carbohydrate contents and productivities as a response to the nitrogen status in *Isochrysis* sp. (T-iso). *J Phycol*
- Lande, R., Wood, A.M. (1987) Suspension times of particles in the upper ocean. *Deep Sea Research* 34:61-72
- Lavin, P.L., Lourenço, S.O. (2005) An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. *Brazilian Journal of Oceanography* 53:55-68
- Le Floc'h, E. (2002) Etude expérimentale des limitations simultanées de l'azote et de la lumière sur la croissance de *Rhodomonas salina* (Cryptophyceae). Université de la méditerranée (Aix-Marseille II)
- Lee, S.G., Yoon, B., Oh, H.M. (1998) Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques* 12:553-556
- Lee, Y.-H., Chen, S.-Y., Wiesner, R.J., Huang, Y.-F. (2004) Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells. *J Lipid Res* 45:1162-1167
- Liang, Y., Mai, K., Sun, S. (2005) Difference in growth, total lipid content and fatty acid composition among 60 clones of *Cylindrotheca fusiformis*. *J Appl Phycol* 17:61-65
- Liu, C., Lin, L. (2001) Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Bot Bull Acad Sin* 42:207-214
- Livne, A., Sukenik, A. (1992) Lipid Synthesis and Abundance of Acetyl CoA Carboxylase in *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) Following Nitrogen Starvation. *Plant Cell Physiol* 33:1175-1181
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lynn, S.G., Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Interlandi, S.J. (2000) Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 36:510-522
- MacIntyre, H.L., Geider, R.J., McKay, R. (1996) Photosynthesis and regulation of rubisco activity in net phytoplankton from Delaware bay. *J Phycol* 32:718-731
- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T., Geider, R.J. (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* 38:17-38
- Francis Mairé, Olivier Bernard, Pierre Masci, Thomas Lacour, Antoine Sciandra (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis* aff. *Galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology* 102: 142–149

- Malara, G., Sciandra, A. (1991) A multiparameter phytoplanktonic culture system driven by microcomputer. *J Appl Phycol* 3:235-241
- Mansour, M.P., Volkman, J.K., Jackson, A.E., Blackburn, S.I. (1999) The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *J Phycol* 35:710-720
- Marra, J., Barber, R.T.G. (2004) Phytoplankton and heterotrophic respiration in the surface layer of the ocean. *Geophysical Research Letters* 31
- Mayzaud, P., Ackman, R.G. (1976) Some empirical observations on the choice of carrier gas in the gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters using wall-coated open tubular columns. *Chromatographia* 9:321-324
- Mayzaud, P., Chanut, J.P., Ackman, R.G. (1989) Seasonal changes of the biochemical composition of marine particulate matter with special reference to fatty acids and sterols. *Mar Ecol Prog Ser* 56:189-204
- Mock, T., Kroon, B.M.A. (2002a) Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--- I: Important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-Limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry* 61:41-51
- Mock, T., Kroon, B.M.A. (2002b) Photosynthetic energy conversion under extreme conditions-- II: the significance of lipids under limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry* 61:53-60
- Monod, J. (1950) La technique de culture continue théorie et applications. *Ann Inst Pasteur* 79:390-410
- Morrison, W.R., Smith, L.M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5:600-608
- Mortensen, S.H., al., e. (1988) Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schtt. Effect of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J Exp Mar Biol Ecol* 122:173-185
- Murata, N., Tasaka, Y. (1997) Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochim Biophys Acta* 1348:10-16
- Murphy, D.J. (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40:325-438
- Myklestad, S.M. (1999) Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci Total Environ* 165:155-164
- Nelson, D.M., Brand, L.E. (1979) Cell division periodicity in 13 species of marine phytoplankton on light:dark cycle. *J Phycol* 15:67-75
- Novick, A., Szilard, L. (1950) Experiment with chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 36:708-719
- Olson, R.J., Vulot, D., Chisholm, S.W. (1986) Effects of environmental stresses on the cell cycle of tow marine phytoplankton species. *Plant Physiol* 80:918-925
- Opote (1974) Lipid and fatty-acid composition of diatoms. *J Exp Bot* 25:823-835
- Orcutt, D.M. (1973) The lipids and elemental composition of diatoms with special reference to the effects on light intensity on lipid composition of *Nitzschia Closterium*. University of Maryland
- Orcutt, D.M., Patterson, G.W. (1974) Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzshia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*). *Lipids* 9:1000-1003
- Osborne, B.A., Geider, R.J. (1986) Effect of nitrate-nitrogen limitation on photosynthesis of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyceae). *Plant, Cell Environ* 9:617-625
- Polymenis, M., Schmidt, E.V. (1997) Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes & Development* 11:2522-2531
- Prezelin, B.B. (1992) Diel Periodicity In Phytoplankton Productivity. *Hydrobiologia* 238:1-35

- Price, L.L., Yin, K., Harrison, P.J. (1998) Influence of continuous light and L:D cycles on the growth and chemical composition of Prymnesiophyceae including coccolithophores. *J Exp Mar Biol Ecol* 223:223-234
- Pruvost, J., Vooren, G.V., Cogne, G., Legrand, J. (2009) Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology* 100:5988-5995.
- Quinn, P.J., Williams, W.P. (1983) The structural role of lipids in photosynthetic membranes. *Biochim Biophys Acta* 737:223-266
- Raven, J., Geider, R. (2003) Adaptation, acclimation and regulation in algal photosynthesis. In: *Photosynthesis in algae* - Larkum AWD, Douglas SE, Raven JA, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p 385-412
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y. (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol* 30:972-979
- Richardson, B., Orcutt, D.M., Schwertner, H.A., Martinez, C.L., Wickline, H.E. (1969) Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* 18:245-250
- Richardson, T.L., Cullen, J. (1995) Changes in buoyancy and chemical composition during growth of a coastal marine diatom: ecological and biogeochemical consequences. *Mar Ecol Prog Ser* 128:77-90
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100-112
- Roessler, P.G. (1990) Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J Phycol* 26:393-399
- Routaboul, J.-M. (2000) Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol* 124:1697-1705
- Sakamoto, T., Bryant, D.A. (1999) Nitrate transport and not photoinhibition limits growth of the freshwater Cyanobacterium *Synechococcus* Species PCC 6301 at low temperature. *Plant Physiol* 119:785-794
- Sakamoto, T., Murata, N. (2002) Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr Opin Microbiol* 5:206-210
- Saoudi-Helis, L., Dubacq, J.-P., Marty, Y., Samain, J.-F., Gudin, C. (1994) Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone T.iso. *J Appl Phycol* 6:315-322
- Sasaki, Y., Nagano, Y. (2004) Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68:1175-1184
- Sayegh, F.A.Q., Radi, N., Montagnes, D.J.S. (2007) Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotifer *Brachionus plicatilis*? *Aquaculture* 273:665-678
- Schober, S., Mittelbach, M. (2007) Iodine value and biodiesel: Is limitation still appropriate? *Lipid Technology* 19:281-284
- Sciandra, A., Gostan, J., Collos, Y., Descolas-Gros, C., Leboulanger, C. (1997) Growth compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnol Oceanogr* 42:1325-1339
- Sciandra, A., Harlay, J., Lefèvre, D., Lemée, R., Rimmelin, P., Denis, M., Gattuso, J.-P. (2003) Response of coccolithophorid *Emiliania huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. *Mar Ecol Prog Ser* 261:111-122

- Sciandra, A., Lazzara, L., Claustre, H., Babin, M. (2000) Responses of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas* sp. to light and nitrogen stresses. *Mar Ecol Prog Ser* 201:107-120
- Sciandra, A., Ramani, P. (1994) The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *J Exp Mar Biol Ecol* 178:1-15
- Sheehan, J.T., Dunahay, J., Benemann, Roessler, P. (1998) A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, Vol. National Renewable Energy Laboratory
- Shifrin, N.S., Chisholm, S.W. (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol* 17:374-394
- Shoaf, W.T., Lium, B.W. (1976) Improved extraction of chlorophyll-*a* And chlorophyll-*b* from algae using dimethylsulfoxide. *Limnol Oceanogr* 21:926-928
- Sicko-goad, L., Simmons, M.S., Lazinsky, D., Hall, J. (1988) Effect of light cycle on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. *J Phycol* 24:1-7
- Siegenthaler, P.-A. (1998) Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p 209-224
- Siegenthaler, P.-A., Trémolière, A. (1998) Role of acyl lipids in the function of photosynthetic membranes in Higher plants. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p 209-224
- Smith, G.J., Zimmerman, R.C., Alberte, R.S. (1992) Molecular and physiological-responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability - Growth of *Skeletonema costatum* in simulated upwelling conditions. *Limnol Oceanogr* 37:989-1007
- Spoehr, H.A., Milner, H.W. (1949) The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant Physiol* 24:120-149
- Stahl, U., al., e. (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol Acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135:1324-1335
- Stobart, K., Mancha, Lenman, Dahlqvist, A., Stymne, S. (1997) Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta* 203:58-66
- Sukenik, A., Bennett, J., Mortain-Bertrand, A., Falkowski, P.G. (1990) Adaptation of the Photosynthetic Apparatus to Irradiance in *Dunaliella tertiolecta*: A Kinetic Study. *Plant Physiol* 92:891-898
- Sukenik, A., Carmeli, Y. (1990) Lipid synthesis and fatty acid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in light-dark cycle. *J Phycol* 26:463-469
- Sukenik, A., Livne, A. (1991) Variations in Lipid and Fatty Acid Content in Relation to Acetyl CoA Carboxylase in the Marine Prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiol* 32:371-378
- Tapon, N., Moberg, K.H., Hariharan, I.K. (2001) The coupling of the cell growth to the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 13:731-737
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J. (1992a) Effects of variations in temperature I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol* 28:481-488
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C. (1992b) Effects of variations in temperature I. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol* 28:488-497
- Thompson, P.A., Harrison, P.J., Whyte, J.N.C. (1990) Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. *J Phycol* 26:278-288

- Tolonen, A.C., Aach, J., Lindell, D., Johnson, Z.I., Rector, T., Steen, R., Church, G.M., Chisholm, S.W. (2006) Global gene expression of *Prochlorococcus* ecotypes in response to changes in nitrogen availability. *Molecular System Biology* 53:1-15
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A. (2002) Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61:15-24
- Tréguer, P., Le Corre, P. (1975) Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'Autoanalyser II Technicon., Vol. Université de Bretagne Occidentale, Brest
- Turpin, D.H.G. (1991) Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J Phycol* 27:14-20
- Tzovenis, I., De Pauw, N., Sorgeloos, P. (2003) Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids II. Effect of different light regimes on the production of fatty acids. *Aquaculture* 216:223-242
- Valenzuela-Espinoza, E., Nunez, R., Nunez-Cabrero, F. (2002) Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculturing Engineering* 25:207-216
- Vaulot, D. (1994) The cell cycle of phytoplankton: coupling cell growth to population growth. *Molecular ecology of aquatic microbes, Conference proceedings, Ciocco, ITALY*, p 1-18
- Viso, A.C., Marty, J.C. (1993) Fatty-Acids From 28 Marine Microalgae. *Phytochemistry* 34:1521-1533
- Vorbeck, M.L., Marinetti, G. (1965) Separation Of Glycosyl Diglycerides From Phosphatides Using Silicic Acid Column Chromatography. *J Lipid Res* 6:3
- Wada, H., Murata, N. (2010) Lipids in thylakoid membranes and photosynthetic cells. In: Wada H, Murata N (eds) *Lipids in photosynthesis - Essential and regulatory functions*. Springer, Dordrecht, The Netherlands., p 1-9
- Welschmeyer, N.A. (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll-*a* in the presence of chlorophyll-*b* and pheopigments. *Limnol Oceanogr* 39:1985-1992
- White, S.H., Ladokhin, A.S., Jayasinghe, S., Hristova, K. (2001) How Membranes Shape Protein Structure. *J Biol Chem* 276:32395-32398 %R 32310.31074/jbc.R100008200
- Yamamoto, H.Y. (2006) Functional roles of the major chloroplast lipids in the violaxanthin cycle. *Planta* 224:719-724

IX. Annexes

ANNEXE 1.....	260
ANNEXE 2.....	261
ANNEXE 3.....	264

Annexe 1

Tableau : Compositions en acides gras et taux d'insaturation des TAG au cours de l'expérience de carence en azote (Chapitre 4).

Temps (j)	0.00	0.56	0.96	4.59	7.59
Acides gras					
14:0	23.78	22.85	23.30	23.51	18.05
15:0	0.17	0.22	0.24	0.45	0.28
16:0	12.16	11.73	12.31	13.97	11.57
18:0	5.79	3.81	3.28	1.07	2.86
19:0	0.18	0.55	0.16	0.24	0.73
20:0	0.23	0.32	0.23	0.16	0.36
22:0	1.32	1.07	1.06	0.90	1.15
Saturé	44.33	41.46	41.26	40.74	36.27
14:1 ω 5	0.15	0.18	0.11	0.15	0.27
16:1 ω 9	0.39	0.65	0.00	0.00	0.52
16:1 ω 7	0.52	0.63	1.33	1.58	1.55
18:1 ω 9	29.84	33.74	35.53	34.14	29.42
20:1 ω 9	0.20	0.07	0.04	0.10	0.00
Monoène	32.57	37.21	38.67	37.12	35.72
16:2 ω 6	0.05	0.04	0.35	0.08	0.26
16:2 ω 4	0.12	0.10	0.16	0.20	0.12
18:2 ω 6	8.51	7.37	6.20	5.19	7.70
20:2 ω 6	0.11	0.20	0.20	0.17	0.00
Diène	8.79	7.72	6.91	5.65	8.08
18:3 ω 6	0.11	0.10	0.11	0.08	0.17
18:3 ω 3	0.59	0.67	0.71	1.34	0.86
Triène	0.91	1.08	1.17	1.80	1.24
18:4 ω 3	3.59	3.23	3.30	6.18	5.64
Tétraène	3.91	3.84	4.69	6.71	6.03
18:5 ω 3	1.86	1.19	0.80	1.05	2.09
20:5 ω 3	0.45	0.49	0.40	0.39	0.61
21:5 ω 3	0.45	0.24	0.27	0.69	0.47
22:5 ω 6	0.87	0.91	0.62	0.67	1.60
22:5 ω 3	0.20	0.17	0.14	0.00	0.00
Pentaène	3.83	3.00	2.24	2.80	4.77
22:6ω3	5.66	5.68	5.06	5.19	7.89

Annexe 2

Revue historique sur les différents modèles de croissance des
végétaux

Les modèles de croissance des végétaux dans l'histoire

De nombreux modèles de croissance des végétaux ont été proposés ces 25 derniers siècles, dont nous exposons ici les principaux et les plus originaux. Les modèles se sont construits pour répondre à deux questions : de quoi se nourrissent les plantes ? Qu'est-ce qui contrôle leur croissance ? Ces modèles ont évolué au cours des siècles avec les avancées de la physiologie végétale et de l'agronomie.

Aristote (384-322 av. JC) propose le premier modèle connu de nutrition végétale. Pour ce philosophe et scientifique, les plantes se nourrissent de matière organique appelé humus qu'elles puisent dans le sol. L'amélioration des rendements agricoles obtenue par l'épandage de matière organique comme le fumier soutenaient cette hypothèse.

En 1627, **Sir Francis Bacon** publie *Sylva sylvarum* qui balaye l'hypothèse d'Aristote. Bacon réussit à faire pousser une rose dans de l'eau et conclut que le sol n'est pas nécessaire pour maintenir les plantes. **Jan Baptist Van Helmont** publie en 1648 (*Ortus medicinae, id est Initia physicae inaudita*) la première expérience quantitative de physiologie végétale et confirme les observations de Bacon. Il fait pousser un saule dans un pot contenant une quantité de sol sec de 90,72 kg et constate que cette quantité n'a diminué en 5 ans que de 56.7 g alors que la masse de l'arbre a augmenté de 76 kg. Il conclut que les plantes sont constituées d'éléments venant de l'eau et non du sol. En 1699, **John Woodward** publie des expériences du même type en faisant croître de la menthe dans différents types d'eau. Il observe que les plantes se développent mieux dans l'eau additionnée de sol que dans l'eau distillée. Il nuance donc l'inutilité du sol dans la croissance des végétaux.

A partir de 1800, on sait que l'eau naturelle n'est pas un corps chimique simple mais une solution de divers « sels minéraux ». On réalise aussi peu à peu que les éléments inorganiques trouvés dans les cendres des matières végétales sont impliqués dans le métabolisme de ces plantes. En 1804, **Nicolas Théodore de Saussure** (1767-1845) publie ses *Recherches chimiques sur la végétation* qui présentent ses travaux sur la nutrition des plantes. Il cultive *Polygonum persicaria* et *Bidens cannabina* dans des solutions de différents sels nutritifs. Il montre par exemple que les nitrates sont indispensables à la croissance. Les plantes ont donc besoin d'eau pour croître, mais elles ont aussi besoin des sels minéraux contenus dans celle-ci. Les recherches sur les nutriments sont poursuivies par **J. Von Sachs** et **J. Knop** qui établissent des milieux de culture suffisant pour la croissance des végétaux (solution de Knop) en réalisant les premières expériences de carence en nutriments. On comprend alors qu'il est possible de réaliser des cultures de végétaux dans de simples solutions aqueuses, on parle d'aquaculture.

De Saussure démontre aussi l'importance de la lumière, de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans la croissance des plantes. **Stephen Hales** avait montré en 1727 que l'air et la lumière contribuent à la croissance des plantes. **Jean Senebier**, un pasteur suisse, à partir des travaux d'Antoine Lavoisier sur la composition de l'air, montre que les plantes consomment du dioxyde de carbone et rejettent du dioxygène lors de cette phase. Au milieu du 18^{ème} siècle les principaux mécanismes impliqués dans la photosynthèse (photo : le soleil, synthèse : le mélange) sont compris.

Le chercheur russe **Famintzin** (1835-1918) est probablement le premier à proposer de faire pousser les algues dans des solutions de sels nutritifs. Il utilise la solution de Knop et étudie l'influence de la lumière sur la croissance des algues. C'est le début de la recherche sur l'écophysiologie des algues.

Annexe 3

Francis Mairet, Olivier Bernard, Pierre Masci, Thomas Lacour, Antoine Sciandra (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis* aff. *Galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology* 102: 142–149



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* under nitrogen limitation

Francis Mairet^{a,*}, Olivier Bernard^a, Pierre Masci^a, Thomas Lacour^b, Antoine Sciandra^b

^a COMORE-INRIA, BP93, 06902 Sophia-Antipolis Cedex, France

^b LOV, UMR 7093, BP28, 06234 Villefranche-sur-mer, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2010

Received in revised form 25 June 2010

Accepted 29 June 2010

Available online 24 July 2010

Keywords:

Phytoplankton

Growth model

Nitrogen starvation

Neutral lipid

Biofuel

ABSTRACT

This article proposes a dynamical model of microalgal lipid production under nitrogen limitation. In this model, intracellular carbon is divided between a functional pool and two storage pools (sugars and neutral lipids). The various intracellular carbon flows between these pools lead to a complex dynamic with a strong discrepancy between synthesis and mobilization of neutral lipids. The model has been validated with experiments of *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-iso) culture under various nitrogen limitation conditions and under nitrogen starvation. The hysteresis behavior of the neutral lipid quota observed experimentally is accurately predicted.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Some microalgal species are known both for their ability to synthesize and accumulate considerable amounts of lipids (Metting, 1996) and for their high growth rate. This potential has led some authors to consider that microalgae could be one of the main bio-fuel producers in the future (Huntley and Redalje, 2007; Chisti, 2007). These authors claimed that biodiesel productivities would be at least in a range of magnitude higher than terrestrial plants productivities. However, the conditions for neutral lipid accumulation (triacylglycerols are the best substrate to produce biodiesel) and for high growth rate are generally antagonistic. Nitrogen starvation increases the cell lipid content but at the same time strongly reduces the growth rate (Pruvost et al., 2009; Rodolfi et al., 2009; Sobczuk and Chisti, 2010). Lipid productivity, which is the outcome of these two factors, requires a trade-off between biomass production and oil content (Hsieh and Wu, 2009; Lv et al., 2010). Nitrogen-limited continuous cultures, which allow the control of the cell growth by maintaining a suboptimal nitrogen level (Falkowski and Raven, 2007), prevent the cells to become starved and to stop growing. Identifying a trade-off between neutral lipid accumulation and growth is therefore a key issue for optimizing biodiesel productivity.

The main objective of our work is to develop a dynamical model able to predict neutral lipid productivity under nitrogen stress in order to propose an optimization strategy. The model is developed on the basis of experiments carried out in various nitrogen conditions

(replete, limitation and starvation) with the prymnesiophyceae *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-iso). The model complexity must result from a trade-off between realism, in order to accurately represent the key variables of the process, and simplicity so that it can be mathematically tractable and suitable for calibration and to solve optimal control problems (Bernard and Queinnec, 2008). The simplest model for describing growth of a population of microalgae limited by nitrogen is the Droop model (Droop, 1968, 1983). This model assumes that the growth rate depends on the intracellular concentration of nitrogen. More accurate models have been proposed to deal with the coupling between nitrogen and carbon assimilation in various light conditions (Geider et al., 1998; Faugeras et al., 2004; Pahlow, 2005; Ross and Geider, 2009), but none of them predict the lipid fraction. The model which is presented in this work is, to our knowledge, the first one dealing with neutral lipid production by microalgae.

The article is structured as follows: in Section 2, the experimental approach is presented and the model design and hypotheses are detailed. Then, we describe the model calibration procedure. In Section 3, we validate the model with experimental data of a *Isochrysis* aff. *galbana* culture, with various rates of nitrogen limitations. Finally, an analysis of the model behaviour is presented and a discussion about neutral lipid productivity concludes the article.

2. Methods

2.1. Experimental approach

Cultures of *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-iso, CCAP 927/14) were grown in 5 L cylindrical vessels at constant temperature

* Corresponding author. Tel.: +33 4 92 38 71 74; fax: +33 4 92 38 78 58.
E-mail address: francis.mairet@inria.fr (F. Mairet).

(22.0 ± 0.1 °C), light (430 ± 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in the centre of the culture vessel) and pH (maintained at 8.2 by automatic injection of CO_2). The experiment consists of imposing nitrogen limitation through a succession of dilution rates changes (1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 d^{-1}). Each dilution rate was maintained until the steady state of the internal quota (which is slower than, e.g. cell density) was apparently reached. Two chemostats were run in parallel under identical conditions except for the final days: dilution was stopped to obtain a nitrogen starvation in photobioreactor A whereas a nitrogen limitation was imposed (with a low dilution rate) in photobioreactor B. The influent nitrogen concentration was modified to maintain biomass concentration in a reduced range and thus avoid any bias that would result from light change in the reactor. Fig. 1 presents the operating conditions. The first part of the experiment (from the beginning to day 18) was used for model calibration, the remaining set of data is kept for model validation.

Nitrate and nitrite concentrations were measured every 2 h with a Technicon Auto-analyzer coupled to an automated data-acquisition system. The concentrations of particulate carbon and nitrogen were determined every day on triplicate samples. Ten millilitres of culture were filtered onto glass-fiber filters (Whatman GF/C) precombusted at 500 °C for 12 h. Filters were kept at 60 °C before elemental analysis with a CHN analyzer (Perkin–Elmer 2400 Series II CHNS/O). Cell concentration and size distribution were automatically measured hourly with an optical particle counter using the principle of light blockage (Hiac/Royco, Pacific Scientific Instruments) and were used to compute biovolume. A correlation between biovolume and particulate carbon is used to convert the biovolume measurements into particulate carbon in order to have an hourly estimate of particulate carbon. Carbohydrate concentrations were determined in duplicate samples of 5 mL of culture filtered onto precombusted glass-fiber filters (Whatman GF/C). Total carbohydrate concentrations were analysed by the phenol method (Dubois et al., 1956). Total lipids were quantitatively extracted using the method of Bligh and Dyer (1959). After an initial extraction of the tissue with a monophasic mixture of chloroform:methanol:water (1:2:0.8, v/v), chloroform and water were added for phase separation. Lipids are present in

the chloroform phase which is evaporated. All lipid extracts were stored at 80 °C until analysis. To avoid lipid auto-oxidation, a nitrogen atmosphere was maintained all the time. Separation of neutral and polar (glycolipids and phospholipids) lipids was achieved on a preparative scale by column chromatography on silica gel (Extract-Clean, Alltech). The neutral lipid fraction was eluted with six column volumes of chloroform, and then evaporated and weighted. Lipid and sugar measurements were converted in g[C] using the following conversion factors: $0.4 \text{ g[C]} \text{ g DW}^{-1}$ for carbohydrates and $0.76 \text{ g[C]} \text{ g DW}^{-1}$ for neutral lipids (Geider and Roche, 2002). For more details on the experiment protocol see Le Floch et al. (2002).

2.2. Model design

The objective of the mathematical model is to support an optimization strategy and to guide the trade-off between growth and lipid accumulation. It must keep complexity at a minimal level to be mathematically tractable. We therefore limited the number of variables to the most important ones. We focus on the growth of microalgae, whose biomass, in terms of organic carbon, is denoted x . These microalgae are limited by an inorganic nitrogen source (nitrate, denoted s). In line with Ross and Geider (2009), we consider that organic carbon can be split into functional and storage pools. The functional compartment (f) includes the biosynthetic apparatus (proteins and nucleic acids) and the structural material (membranes mainly made of glycolipids and phospholipids). However, we add a new distinction: the storage pool is divided into a sugar reserve compartment (g) and a neutral lipid reserve compartment (l).

Nutrient uptake and biomass growth are known to be uncoupled processes for microalgae (Droop, 1983) leading thus to variations in the internal quota of nutrient.

Nutrient is taken up by the microalgae to make cellular nitrogen (n) at rate $\rho(s)$. This flux of nitrogen can be summarized in the following macroscopic reaction which represents the mass flux between the inorganic and organic compounds:



The absorption rate $\rho(s)$ is taken as a Michaelis–Menten function:

$$\rho(s) = \rho_m \frac{s}{s + K_s} \quad (2)$$

with K_s the half-saturation constant for the substrate and ρ_m the maximum uptake rate.

In line with the Droop modelling approach, we consider that the specific growth rate μ , i.e. the net incorporation of CO_2 is an increasing function of the internal quota of nutrient ($q_n = \frac{n}{x}$). We assume that inorganic carbon is first incorporated in the pool of sugars g :



This macroscopic reaction summarizes the set of reactions that occur in the dark phase of photosynthesis, and that lead, through the Calvin cycle to the production of carbohydrates such as glucose 6-phosphate (Falkowski and Raven, 2007). The mathematical expression for the specific growth rate μ is chosen using Droop model (Droop, 1968):

$$\mu(q_n) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{Q_0}{q_n} \right) \quad (4)$$

where $\bar{\mu}$ and Q_0 represent the theoretical maximum growth rate and the minimum nitrogen quota allowing growth, respectively.

The sugar compartment g is then used in a second stage to synthesize the functional elements of the biomass f :

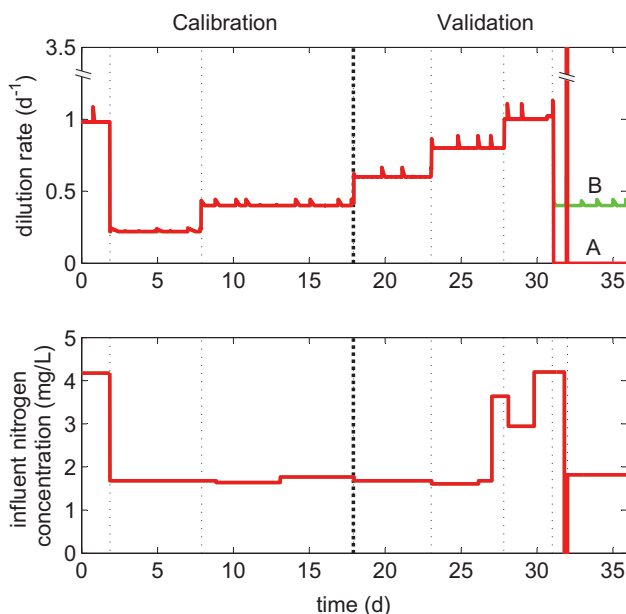


Fig. 1. Operating conditions for experiment with *Isochrysis aff. galbana*. Dilution rate variations impose various nitrogen limitations. At the end, in photobioreactor A dilution was stopped to obtain a nitrogen starvation whereas in photobioreactor B a nitrogen limitation was imposed with a low dilution rate.



This reaction corresponds mainly to the synthesis of proteins and nucleic acids, which depends on nitrogen availability. We therefore consider as in Ross and Geider (2009) that the synthesis rate is proportional to the nitrogen assimilation rate.

The sugar compartment g is also used in a parallel pathway to synthesize free fatty acids (FFA):



We assume that this rate of fatty acid synthesis depends on the photosynthesis rate $\mu(q_n)$, but that it is also modulated by the nitrogen quota. This assumption is based on the work of Sukenik and Livne (1991) who have explored the relationship between growth rate and lipid production in nitrogen limited cultures of *Isochrysis aff. galbana*.

These fatty acids are then mobilized to the production of functional carbon (mainly membranes):



The rate of this reaction is assumed to be proportional to the synthesis of proteins and nucleic acids (reaction (5)).

Finally, as free fatty acids are not stored in the cell (Ohlrogge and Browse, 1995; Guschina and Harwood, 2009), neutral lipids (i.e. mainly triglycerides) are used to store or to provide fatty acids when there is a disequilibrium between fatty acid synthesis (reaction (6)) and mobilization (reaction (7)):



We assume that this reaction rate is fast enough compared to the other reactions to maintain a constant FFA quota. Moreover, we consider that FFA pool is of negligible size (Ohlrogge and Browse, 1995; Guschina and Harwood, 2009) so that the model does not describe its dynamic.

A representation of the carbon flows is given in Fig. 2a. This scheme can be simplified (see Fig. 2b) assuming a low and constant FFA quota.

Assuming that the main mass transfer of carbon and nitrogen can be summarized by the reactions (1)–(8), the time-varying evolution equations resulting from mass balances considerations (Bastin and Dochain, 1990) in a homogeneous photobioreactor are given by:

$$\begin{cases} \dot{s} = Ds_{in} - \rho(s)x - Ds \\ \dot{n} = \rho(s)x - Dn \\ \dot{g} = (1 - \beta q_n)\mu(q_n)x - \alpha\rho(s)x - Dg \\ \dot{l} = \beta q_n\mu(q_n)x - \gamma\rho(s)x - Dl \\ \dot{f} = (\alpha + \gamma)\rho(s)x - Df \end{cases} \quad (9)$$

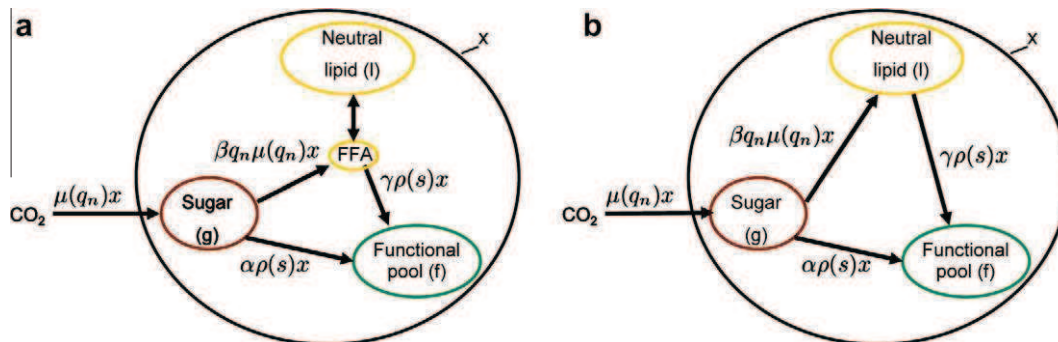


Fig. 2. (a) Representation of the carbon flows. The dynamics of neutral lipids result from the unbalance between fatty acid synthesis and mobilization. (b) Model simplification assuming that the quota of free fatty acids is very low and almost constant.

where D is the dilution rate (ratio of the influent flow rate over the photobioreactor volume) and s_{in} the influent nitrate concentration.

From Eq. (9) we can deduce the dynamics of the nitrogen quota q_n , the carbon biomass which is the sum of the three carbon pools $x = f + g + l$, and the quotas of neutral lipid $q_l = l/x$ and functional carbon $q_f = f/x$, leading to the following set of equations:

$$\begin{cases} \dot{s} = Ds_{in} - \rho(s)x - Ds \\ \dot{q}_n = \rho(s) - \mu(q_n)q_n \\ \dot{x} = \mu(q_n)x - Dx \\ \dot{q}_l = (\beta q_n - q_l)\mu(q_n) - \gamma\rho(s) \\ \dot{q}_f = -q_f\mu(q_n) + (\alpha + \gamma)\rho(s) \end{cases} \quad (10)$$

It is worth noting that the first three equations of system (10) are exactly the Droop model (Droop, 1968, 1983). This model presents the advantage of being simple and having been extensively studied and validated (Droop, 1983; Sciandra and Ramani, 1994; Bernard and Gouzé, 1999). Moreover, the system has a cascade structure: the dynamics of the fractions q_l and q_f are not involved in the first three equations.

3. Model calibration

3.1. Parameter value computation

First, we present some model properties that will be used to identify the parameter values. In the Droop model, it can be proved (see Bernard and Gouzé, 1995) that the nitrogen quota stays between two bounds:

$$Q_0 \leq q_n \leq Q_m \quad (11)$$

with

$$Q_m = Q_0 + \frac{\rho_m}{\mu} \quad (12)$$

Q_m represents the maximum cell quota obtained in conditions of non limiting nutrients, and the minimum quota, Q_0 , is obtained in batch conditions after limiting nutrient depletion. Thus, we can deduce a maximal growth rate μ_m :

$$\mu_m = \mu(Q_m) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{Q_0}{Q_m} \right) \quad (13)$$

This property will be used to compute $\bar{\mu}$, from the minimal and maximal nitrogen quota Q_0 and Q_m :

$$\bar{\mu} = \mu_m \frac{Q_m}{Q_m - Q_0} \quad (14)$$

In order to simplify steady state computation for the quotas of neutral lipid q_l^* and functional carbon q_f^* , the dynamics of q_l and q_f in (10) can be rewritten:

$$\begin{cases} \dot{q}_l = [(\beta - \gamma)q_n - q_l]\mu(q_n) - \gamma\dot{q}_n \\ \dot{q}_f = [(\alpha + \gamma)q_n - q_f]\mu(q_n) + (\alpha + \gamma)\dot{q}_n \end{cases} \quad (15)$$

At steady state, as $\dot{q}_n = 0$, we obtain the following equilibrium:

$$\begin{cases} q_l^* = (\beta - \gamma)q_n^* \\ q_f^* = (\alpha + \gamma)q_n^* \end{cases} \quad (16)$$

The model predicts thus, at steady state, that neutral lipid and functional carbon quotas are proportional to the nitrogen quota. Steady state of the sugar quota q_g^* is deduced from the relation $q_l + q_f + q_g = 1$:

$$q_g^* = 1 - (\beta + \alpha)q_n^* \quad (17)$$

As both $q_l^*(q_n)$ and $q_f^*(q_n)$ are linear increasing functions, $q_g^*(q_n)$ is a linear decreasing function.

Parameters α , β and γ can then be computed from the previous equations, using quota measurements at steady state.

3.2. Parameter estimation

The model is calibrated using the first part of the experiment (from the beginning to day 18), the remaining set of data is kept in order to further evaluate the validity of the model. We uncouple the estimation into two groups of parameters: the Droop parameters (Q_0 , $\bar{\mu}$, ρ_m , K_s) and the intracellular carbon flow parameters (α , β , and γ). The Droop parameters can be easily determined, on the basis of dedicated experimental conditions, and then, the carbon parameters are identified.

The minimal nitrogen quota Q_0 is obtained from the nitrogen quota measurement during a nitrogen starvation experiment (data not shown). The maximum nitrogen quota Q_m and specific growth rate μ_m are estimated directly from the nitrogen quota measurements and the dilution rate during the non-limited growth phase (at the beginning of the experiment, see Fig. 3). The maximal absorption rate ρ_m and growth parameter $\bar{\mu}$ are obtained with relations (12) and (14). The half-saturation constant K_s is taken from previous experiments (data not shown).

The second step of the calibration procedure concerns the intracellular carbon flow parameters. The data obtained at steady state for two dilution rates (at days 2 and 17) are used to determine, thanks to Eq. (16), the parameters α , β , and γ : using an estimation of the slopes of $q_l^*(q_n)$ and $q_f^*(q_n)$ lines, we obtain a system of two equations with three unknown parameters. This system is used to calibrate the model with only one degree of freedom and thus obtain a first estimate of these parameters. Finally, the Levenberg-Marquardt minimization algorithm (function lsqcurvefit under Matlab®) initialised with these values is used as a final adjustment between model simulation and experimental data (from the beginning to day 18). Calibration results are given in Table 1.

4. Results and discussion

4.1. Model simulation

The model was simulated and results were compared with experimental data of a *Isochrysis aff. galbana* culture, with various nitrogen limitations. The second part of the experiment (from day 18 to the end) was used in order to validate the model with experimental data not used for model calibration. Results shown in Fig. 3 demonstrate that the model predicts quite accurately the dynamics of nitrate concentration s , nitrogen quota q_n and biomass x . This corroborates the fact that the Droop model has been widely validated (Droop, 1983; Sciandra and Ramani, 1994; Bernard and Gouzé, 1999) for its aptitude to predict both biomass and remaining inorganic nitrogen. The low nitrogen quota for most

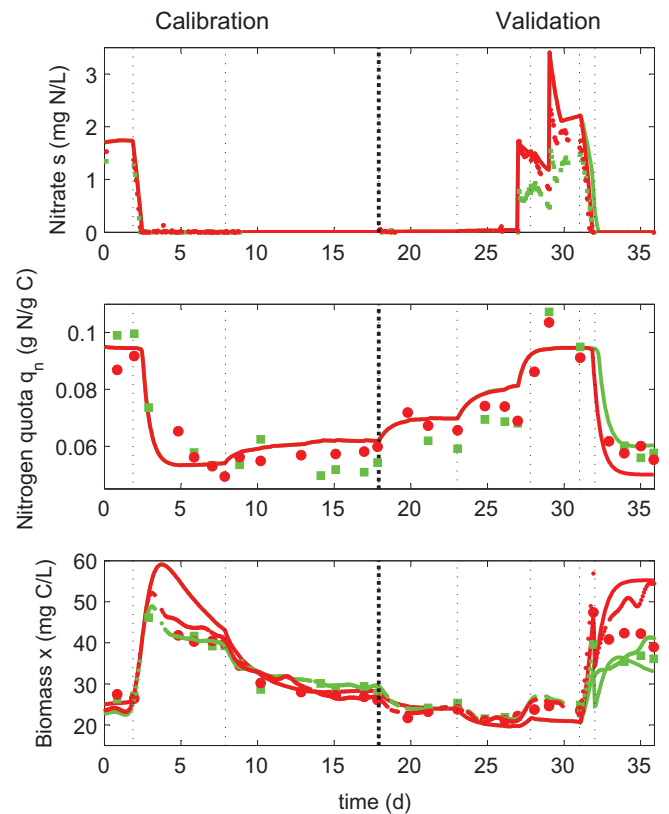


Fig. 3. Comparison of the Droop model (lines) with the data (symbols) of *Isochrysis aff. galbana* culture under various nitrogen conditions. Red lines and circles: photobioreactor A (ended by a nitrogen starvation) and green lines and squares: photobioreactor B (ended by a nitrogen limitation). Carbon biomass is measured (circles and squares) and deduced from biovolume measurements (dots). Vertical lines indicate dilution rate changes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Parameters obtained by the calibration of the model.

Parameter	Value
Minimal nitrogen quota, Q_0	0.05 mg[N] mg[C] ⁻¹
Maximal nitrogen quota, Q_m	0.095 mg[N] mg[C] ⁻¹
Maximal growth rate, μ_m	1 d ⁻¹
Protein synthesis coefficient, α	2.6 mg[C] mg[N] ⁻¹
Fatty acid synthesis coefficient, β	4.8 mg[C] mg[N] ⁻¹
Fatty acid mobilization coefficient, γ	3.0 mg[C] mg[N] ⁻¹
Half-saturation constant, K_s	0.018 mg[N] L ⁻¹
Theoretical maximum growth rate, $\bar{\mu}^a$	2.11 d ⁻¹
Maximal uptake rate, ρ_m^a	0.095 mg[N] mg[C] ⁻¹ d ⁻¹

^a Parameters computed from Q_0 , Q_m and μ_m .

of the experiment confirms that the cells are nitrogen limited, and that several levels of limitation are experimented, ranging from starvation to repletion. The simulated and experimental distributions of intracellular carbon between sugars, neutral lipids and functional pool are presented in Fig. 4. The model accurately predicts the behaviour of the carbon quotas during all the experiment, in spite of the fact that it has been calibrated only with the first part of the experiment. Moreover, the evolution of the distribution of intracellular carbon is well described both in steady states and in dynamic conditions.

4.2. Steady states

We can also analyse the behaviour of the model in order to explain the complex dynamics of the distribution of intracellular

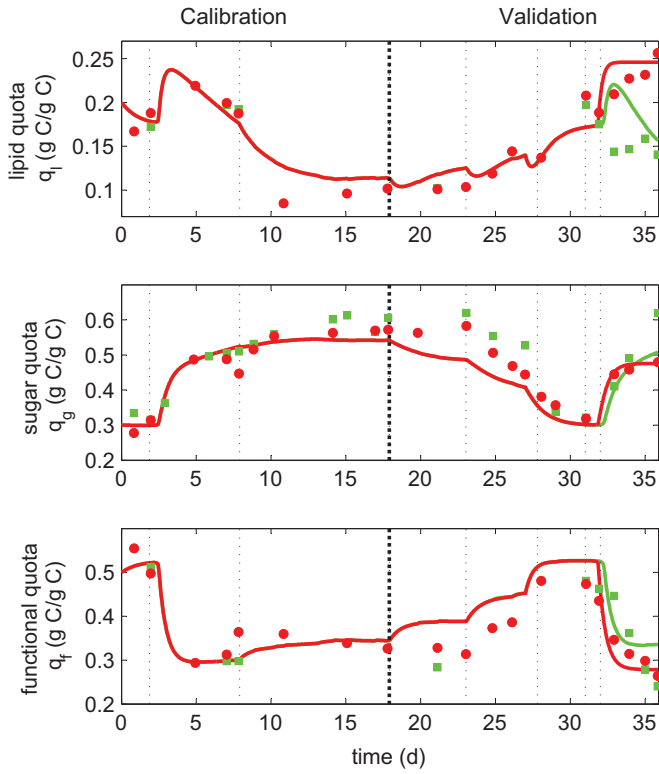


Fig. 4. Comparison of the predicted neutral lipid and sugar quotas (lines) with experimental data (symbols) of *Isochrysis aff. galbana* culture under various nitrogen limitation rates. Red lines and circles: photobioreactor A (ended by a nitrogen starvation) and green lines and squares: photobioreactor B (ended by a nitrogen limitation). Vertical lines indicate dilution rate changes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

carbon. In stabilized culture, Eqs. (16) and (17) show that the quotas of neutral lipid, sugar and functional carbon are linearly correlated to the nitrogen quota. This result is validated with the experimental data obtained at steady states in chemostats run at various dilution rates (see Fig. 5). Therefore, a high nitrogen quota leads at equilibrium to a high neutral lipid quota and a low sugar quota.

4.3. Model reduction

Let us assume that we start at t_0 from a steady state condition. Let us denote $\delta = (\alpha + \gamma)q_n - q_f$. From Eq. (16), we get $\delta(t_0) = 0$. Moreover, using Eq. (15) we have $\dot{\delta} = -\delta\mu(q_n)$. As a consequence, $\delta(t) = 0$ for $t \geq t_0$, and thus:

$$q_f(t) = (\alpha + \gamma)q_n(t) \quad (18)$$

Therefore, the functional quota is proportional to the nitrogen quota. This correlation is validated by experimental data on Fig. 5. Thus, equation \dot{q}_f of the model (10) can be removed and substituted by Eq. (18). Note that this correlation is also obtained in Ross and Geider (2009). These authors consider that cellular nitrogen is contained only in the functional pool which has a fixed N:C ratio, explaining thus the correlation between nitrogen and functional quotas.

4.4. Hysteresis behaviour

Let us consider a situation where the cells are in a steady state characterized by a high nitrogen content q_{n1}^* . If the dilution rate is decreased, the cells undergo a decrease of their nitrogen quota

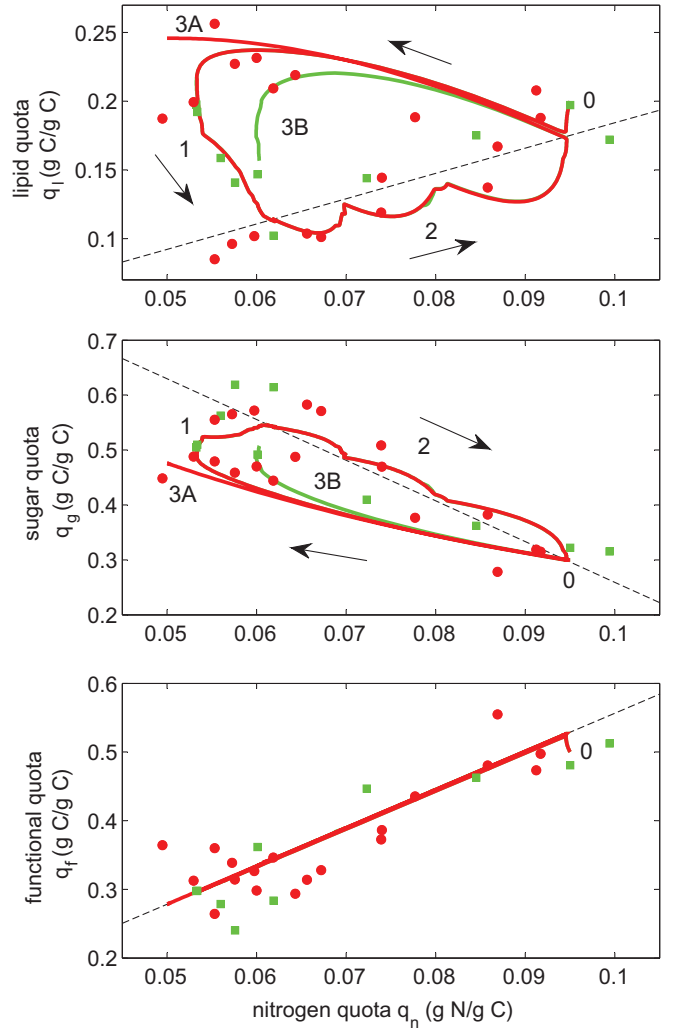


Fig. 5. Hysteresis behaviour of neutral lipid and sugar quotas as a function of nitrogen quota: comparison of model (lines) and experimental data (symbols). Red lines and circles: photobioreactor A (ended by a nitrogen starvation); green lines and squares: photobioreactor B (ended by a nitrogen limitation); and dashed line: model equilibrium. Numbers and arrows indicate the chronological sequence: (1) nitrogen limitation, (2) decrease of the nitrogen stress, (3A) starvation or (3B) limitation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

down to a value $q_{n2}^* < q_{n1}^*$. This means that, during this transient, we have $\dot{q}_n < 0$ (Bernard and Gouzé, 1995). We consider variable $z = q_l - (\beta - \gamma)q_n$ representing the distance between the lipid quota and its equilibrium value. Using Eq. (15) for \dot{q}_l , the dynamics of z are:

$$\dot{z} = -z\mu(q_n) - \beta\dot{q}_n \quad (19)$$

As z is initially null (steady state), z remains non-negative during this transient so that q_l stays above the equilibrium line of equation $q_l^* = (\beta - \gamma)q_n^*$. Once the nitrogen quota has reached its steady state value, we have $\dot{q}_n = 0$. It follows that z tends toward zero and q_l finally reaches its steady state on the line $q_l^* = (\beta - \gamma)q_n^*$.

Note that this behaviour is possible only since $\mu(q_n)$ is not zero, and is decreasing from $\mu(q_{n1})$ down to $\mu(q_{n2}) > 0$.

This transient behaviour of q_l is observed on Fig. 5 (phase 1).

The same reasoning can explain the behaviour of the lipid content, when the internal nitrogen quota is increased (following for example an increase in the dilution rate). In this case, we can show that q_l will increase but stay under the line $q_l^* = (\beta - \gamma)q_n^*$ (see

Fig. 5, phase 2). This behaviour leads to a phenomenon of hysteresis: the trajectory between two steady states when nitrogen limitation is increasing is very different from the trajectory after a decrease in nitrogen limitation (see Fig. 5).

4.5. Nitrogen starvation

In case of nitrogen starvation (i.e. $s^* = 0$), q_n decreases from Q_m down to Q_0 (where growth stops). The lipid quota does not reach the equilibrium line but since growth stops, it reaches a steady state value q_l^\dagger which can be computed as follows (see Appendix A for details):

$$q_l^\dagger = Q_0 \left[(\beta - \gamma) + \beta \ln \left(\frac{Q_m}{Q_0} \right) \right] \quad (20)$$

If the parametric condition

$$\frac{\beta - \gamma}{\beta} < \frac{Q_0}{Q_m - Q_0} \ln \left(\frac{Q_m}{Q_0} \right) \quad (21)$$

is verified, expression (20) shows that the final lipid content after nitrogen exhaustion is greater than $(\beta - \gamma)Q_m$, the maximum amount of lipid reached in balanced growth. It means that lipid content is higher after nitrogen starvation, than at unlimited growth rate. With the computed parameters (Table 1), condition of Eq. (21) is fulfilled for *Isochrysis* aff. *galbana*. Nitrogen starvation at the end of the experiment in photobioreactor A confirms this result: the lipid content is increased during the batch phase where internal nitrogen quota reaches its minimal value. Nevertheless, the lipid content response to nitrogen starvation is known to be highly species dependent, and some species can reach higher lipid quota in nitrogen replete conditions compared to nitrogen starvation (Griffiths and Harrison, 2009). This means that the condition of Eq. (21) may not be satisfied for such species.

A comparison between nitrogen limitation (starting at day 2 and 31 in photobioreactor B) and nitrogen starvation (starting at day 31 in photobioreactor A) is of particular interest. The model predicts that such a protocol should lead to radically different behaviour of neutral lipid quota. For nitrogen limitation, a lower value of the lipid content should be reached after a transient increase, while the starvation should lead to an enhanced value of q_l , higher than the maximum obtained in balanced growth conditions. Fig. 4 and 5 show that these predictions are experimentally verified.

4.6. Behaviour of sugar quota

Using the same approach as in Section 4.4, we can show that, when the internal nitrogen quota is increased (resp. decreased), the sugar quota q_g will decrease over (resp. increase under) the equilibrium line $q_g^* = 1 - (\beta + \alpha)q_n^*$. The experimental data in Fig. 5 validates this phenomenon of hysteresis for the sugar quota.

The sugar quota q_g^\dagger obtained after nitrogen starvation can be computed from Eqs. (18) and (20):

$$q_g^\dagger = 1 - q_l^\dagger - (\alpha + \gamma)Q_0 \quad (22)$$

Note that a starvation and a limitation both lead to a sugar quota increase but the starvation gives a smaller quota than a limitation (see Fig. 5).

4.7. Neutral lipid accumulation

The proposed model, supported by the experimental results, can help in explaining the distribution of intracellular carbon. During nitrogen starvation, production of functional carbon (reactions (5) and (7)) is stopped so that the incoming carbon is stored in

sugar and neutral lipid pools, leading to an increase of these quotas until growth stops (once the nitrogen quota has reached its minimum) (Thompson, 1996; Sobczuk and Chisti, 2010).

The distribution of intracellular carbon points towards a complex behaviour in response to other nitrogen conditions (see Fig. 4 and 5). The dynamic of neutral lipid quota is due to the imbalance between biomass growth (inducing intracellular dilution) and neutral lipid net production. Neutral lipid net production (reaction (8)) is itself the difference between fatty acid production (reaction (6)) and its mobilization (reaction (7)). It is generally accepted that microalgae produce more fatty acids than they need under non-stress conditions (Thompson, 1996) leading thus to the production of neutral lipids to store the excess.

From extensive simulations, it appears that neutral lipid net production predicted by the model is always positive except during the transient recovery from nitrogen starvation or limitation. This result is consistent with observations of Khozin-Goldberg et al. (2005) with *Parietochloris incisa* which show that neutral lipid are mobilized for the construction of chloroplastic membranes following recovery from nitrogen starvation. Livne and Sukenik (1992) have also suggested that the recovery of lipid synthesis rate was slower than division rate. Therefore, in such a case, neutral lipids are mobilized in order to compensate for the delay in the fatty acid productions and ensure rapid recovery of growth.

Note that neutral lipid utilization is also observed in response to a low-temperature induced stress (Cohen et al., 2000) or in darkness (Thompson, 1996). The light and temperature effects on growth and lipid accumulation are beyond the scope of this article but the model could be modified to take it into account.

4.8. Neutral lipid and sugar productivities

In a continuous culture, the steady states computed using Eq. (10) are defined by Eq. (16) and:

$$\begin{cases} q_n^* = \frac{\mu Q_0}{\mu - D} \\ s^* = \frac{K_s D q_n^*}{\rho_m - D q_n^*} \\ x^* = \frac{s_{in} - s^*}{q_n^*} \end{cases} \quad (23)$$

Biomass, sugar and neutral lipid productivities (denoted, respectively, P_x , P_g and P_l) in a continuous culture at equilibrium can be computed from model equations as follows:

$$\begin{cases} P_x = D x^* \\ P_g = D x^* q_g^* \\ P_l = D x^* q_l^* \end{cases} \quad (24)$$

The model accurately predicts the experimental productivities in continuous culture (see Fig. 6). It can thus forecast the maximal neutral lipid productivity, obtained for a growth rate $\mu = 0.95 \text{ d}^{-1}$, i.e. for 95% of the maximal growth rate. The productivity trade-off is then mainly driven by the growth rate. The maximal sugar productivity is obtained for a growth rate $\mu = 0.66 \text{ d}^{-1}$, i.e. for 66% of the maximal growth rate. In that case, the corresponding trade-off is more influenced by carbohydrate accumulation. As this work is focused on lipid kinetics in relation to nitrogen status, only diluted cultures have been considered in order to avoid any experimental bias due to light change or light gradient. The prediction of maximal reachable productivities for high density culture should then also include modelling of growth in the light gradient, involving radiative transfer modelling (Pruvost et al., 2009).

This steady state analysis for a continuous process can, however, not straightforwardly be compared to the productivity obtained in batch. In such a case, the previous scenario of continuous production must be compared to a scenario of two stage batch production, with a first phase of biomass growth and

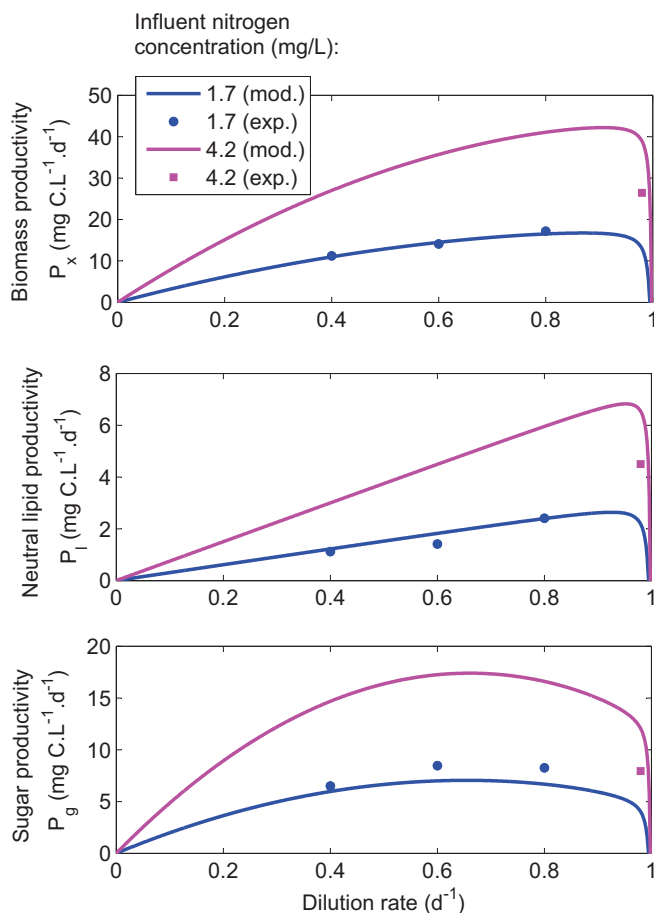


Fig. 6. Biomass, neutral lipid and sugar productivities: comparison of model (lines) and experimental data (symbols) with influent nitrogen concentration $s_{in} = 1.7$ mg/L (in blue) and $s_{in} = 4.2$ mg/L (in magenta). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

a second phase of nitrate exhaustion and nitrogen starvation, as proposed by Huntley and Redalje (2007). From a theoretical point of view, this is a complex and challenging optimal control problem with non-linear dynamics. However, to solve such a problem, light intensity must also be taken into account in the model, and a radiative transfer model must be associated to predict the light gradient. Only the outcome of these two models can predict productivity in realistic large-scale production, i.e. under natural irradiance and light limitation. Currently, insufficiently rigorous experimental data limit comparison of these two possible working modes (Griffiths and Harrison, 2009). Finally, a combination of these two working modes may be the optimal solution: a biomass production in continuous culture followed by a batch starvation in order to increase the neutral lipid content (Sobczuk and Chisti, 2010).

5. Conclusions

We have presented a model for neutral lipid production by microalgae. Its strength is to predict accurately both the steady state and the transient phases in various physiological conditions from low nitrogen limitation to starvation. The model, based on the Droop approach, has a minimal degree of complexity so that it can be mathematically analysed. It highlights and explains the hysteresis phenomenon in neutral lipid production which has been experimentally verified: the lipid dynamics after nitrogen

starvation is highly different from the dynamics after nitrogen recovery. The model must be assessed and validated with other microalgal species. Coupled with a model of light distribution, it will then be used to predict and optimize lipid production in the perspective of large-scale biofuel production.

Acknowledgement

This paper presents research results supported by the ANR-06-BIOE-014 Shamash project.

Appendix A. Computation of final lipid quota after nitrogen starvation

The dynamics of q_n and q_l , once external nitrate have been exhausted are:

$$\begin{cases} \dot{q}_n = -\mu(q_n)q_n \\ \dot{q}_l = (\beta q_n - q_l)\mu(q_n) \end{cases} \quad (25)$$

Using these equations, the dynamic of $v = \frac{q_l}{q_n}$ is:

$$\dot{v} = \frac{q_n \dot{q}_l - q_l \dot{q}_n}{q_n^2} = -\frac{\beta}{q_n} \dot{q}_n \quad (26)$$

Integrating from t_1 to t_2 , we obtain:

$$v_2 - v_1 = \int_{t_1}^{t_2} \dot{v} dt = \int_{q_{n1}}^{q_{n2}} -\frac{\beta}{q_n} dq = [-\beta \ln q_n]_{q_{n1}}^{q_{n2}} \quad (27)$$

Now consider a complete starvation from a non-limited equilibrium, i.e. $q_{n1} = Q_m$, $q_{l1} = (\beta - \gamma)Q_m$, $q_{n2} = Q_0$ and $q_{l2} = q_l^*$, the last expression becomes:

$$\frac{q_l^*}{Q_0} - \frac{(\beta - \gamma)Q_m}{Q_m} = [-\beta \ln q_n]_{Q_m}^{Q_0} = \beta \ln \frac{Q_m}{Q_0} \quad (28)$$

From this equation, we can deduce the expression of q_l^* .

References

- Bastin, G., Dochain, D., 1990. On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Elsevier, New York.
- Bernard, O., Gouzé, J.-L., 1995. Transient behavior of biological loop models, with application to the Droop model. *Math. Biosci.* 127 (1), 19–43.
- Bernard, O., Gouzé, J.-L., 1999. Nonlinear qualitative signal processing for biological systems: application to the algal growth in bioreactors. *Math. Biosci.* 157, 357–372.
- Bernard, O., Queinnec, I., 2008. Dynamic models of biochemical processes: properties of models. In: Dochain, D. (Ed.), *Bioprocess Control*. Wiley, Hoboken (Chapter 2).
- Bligh, E., Dyer, W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., Bigogno, C., 2000. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 740–743.
- Droop, M.R., 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc.* 48 (3), 689–733.
- Droop, M.R., 1983. 25 years of algal growth kinetics, a personal view. *Botan. Marina* 16, 99–112.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2007. *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press, Princeton.
- Faugeras, B., Bernard, O., Sciandra, A., Levy, M., 2004. A mechanistic modelling and data assimilation approach to estimate the carbon/chlorophyll and carbon/nitrogen ratios in a coupled hydrodynamical-biological model. *Nonlinear Process. Geophys.* 11, 515–533.
- Geider, R., MacIntyre, H., Kana, T., 1998. A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol. Oceanogr.* 43, 679–694.
- Geider, R.J., Roche, J.L., 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37, 1–17.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21, 493–507.

- Guschina, I., Harwood, J., 2009. Algal Lipids and Effect of the Environment on their Biochemistry. Springer, New York.
- Hsieh, C.-H., Wu, W.-T., 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour. Technol.* 100, 3921–3926.
- Huntley, M., Redalje, D., 2007. CO₂ mitigation et renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigat. Adaptat. Strat. Global Change* 12, 573–608.
- Khazin-Goldberg, I., Shrestha, P., Cohen, Z., 2005. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. *Biochim. Biophys. Acta* 1738, 63–71.
- Le Floc'h, E., Malara, G., Sciandra, A., 2002. An automatic device for in vivo absorption spectra acquisition in phytoplanktonic cultures: application to the study of photoadaptation to light and nutrient variations. *J. Appl. Phycol.* 14, 435–444.
- Livne, A., Sukenik, A., 1992. Lipid synthesis and abundance of acetyl CoA carboxylase in *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) following nitrogen starvation. *Plant Cell Physiol.* 33, 1175–1181.
- Lv, J.-M., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., Zhang, L., Chen, H.-L., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresour. Technol.* 101, 6797–6804.
- Metting, F., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 17, 477–489.
- Ohlrogge, J., Browse, J., 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957–9708.
- Pahlow, M., 2005. Linking chlorophyll nutrient dynamics to the Redfield N:C ratio with a model of optimal phytoplankton growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 287, 33–43.
- Pruvost, J., Vooren, G.V., Cogne, G., Legrand, J., 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 100, 5988–5995.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102 (1), 100–112.
- Ross, O., Geider, R., 2009. New cell-based model of photosynthesis and photo-acclimation: accumulation and mobilisation of energy reserves in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 383, 53–71.
- Sciandra, A., Ramani, P., 1994. The limitations of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 178, 1–15.
- Sobczuk, T., Chisti, Y., 2010. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 100–108.
- Sukenik, A., Livne, A., 1991. Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA carboxylase in the marine Prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiol.* 32, 371–378.
- Thompson Jr., G.A., 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 17–45.